

**Expression und Regulation von Enzymen des
Östrogenmetabolismus in humanen Endometriumläsionen
kultiviert in der Nacktmaus**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Biologie und Geographie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Sabine Firnhaber

aus Essen

Juni 2006

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie der Universität-Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. E. Winterhager

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. De Groot

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. M. Ehrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2006

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Durchführung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt vor allem Frau PD Dr. Ruth Grümmer sowie Frau Prof. Dr. Elke Winterhager für die Überlassung des interessanten Themas, die intensive Unterstützung und gute Betreuung dieser Arbeit sowie ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Ebenso bedanke ich mich bei PD Dr. Hubert Heinrich Thole, PD Dr. Bettina Husen und Dr. Christiane Böcker von dem Solvay Pharmaceuticals Forschungslabor, Hannover, für die Betreuung dieser Arbeit und die Überlassung von Testsubstanzen.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Winterhager für das sehr gute Arbeitsklima und die jederzeit gewährten Hilfestellungen, hierbei besonders Dr. Isabella Gashaw, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Verfügung stand.

Ich bedanke mich bei Daniela Kottmann, Natalie Knipp, Georgia Rauter und Gabriele Sehn für die Unterstützung bei der Laborarbeit, sowie bei Dave Kittel für die Hilfe bei der Bildbearbeitung.

Der Abteilung für Gynäkologie des Universitätsklinikums Essen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Kimmig und insbesondere Herrn Dr. Markus Schmidt danke ich für die Bereitstellung der Gewebeprobe. Dem Hormonlabor der Abteilung für Gynäkologie und hierbei vor allem Frau Gisela Köstner danke ich für die Analyse der Serumhormonwerte.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann Joachim Firnhaber, die mich mit viel Geduld während der gesamten Zeit dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Die vorliegende Arbeit wurde durch Solvay Pharmaceuticals gefördert.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Krankheitsbild der Endometriose	1
1.1.1 Theorien zur Entstehung der Endometriose	1
1.1.2 Die peritoneale Endometriose	3
1.1.3 Klinische Manifestation der Endometriose	4
1.2 Diagnose und Therapieansätze bei Endometriose.....	6
1.2.1 Etablierte Therapiewege	6
1.2.2 Neue Therapiewege.....	9
1.3 Östrogen-metabolisierende Enzyme als therapeutische Targets	12
1.4 Tiermodelle zur Untersuchung der Endometriose.....	17
1.5 Zielsetzung der Arbeit	19
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Humanes Endometriumgewebe: Entnahme und Aufarbeitung	20
2.1.1 Eutopes Endometrium.....	20
2.1.2 Endometriotische Läsionen	21
2.2 Untersuchungen im Nacktmausmodell	21
2.2.1 Versuchstiere.....	21
2.2.2 Ovariectomie und Hormonsubstitution	22
2.2.3 Transplantation der endometrialen Fragmente und ektopen Läsionen	22
2.2.4 Substanzapplikation	23

2.2.5 Entnahme der transplantierten endometrialen Fragmente.....	25
2.2.6 Bestimmung von Organgewichten und Serumhormonwerten der Nacktmäuse	25
2.2.7 Bestimmung des Zyklusstadiums der Nacktmäuse.....	26
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	26
2.3.1 RNA-Isolierung.....	26
2.3.2 DNase-Verdau.....	27
2.3.3 Reverse Transkription (RT)	27
2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
2.4 Immunhistochemische Untersuchungen	32
2.5 Statistische Auswertung.....	34
2.6 Verwendete Lösungen.....	35
2.7 Feinchemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	36
2.8 Abkürzungen	37
3. ERGEBNISSE	40
3.1 Untersuchungen an eutopen humanen Endometrien von Patientinnen mit und ohne Endometriose und an Endometrioseherden	40
3.1.1 Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in eutopen humanen Endometrien	40
3.1.2 Expression von Steroid-konvertierenden Enzymen in eutopen humanen Endometrien	42
3.1.3 Immunhistochemische Lokalisation von Aromatase in ektopen endometriotischen Läsionen im Vergleich zum korrespondierenden eutopen Endometrium	47
3.2 Untersuchungen an in der Peritonealhöhle von Nacktmäusen kultivierten humanem Endometriumgewebe	48

3.2.1 Kultur von humanem Endometrium in zyklischen sowie in ovariectomierten, hormonsubstituierten Mäusen	48
3.2.2 Expression von Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzymen in humanem Endometrium kultiviert in der Nacktmaus unter Einfluss von Pharmaka	62
3.2.3 Kultur von humanem Endometrium in mit Testsubstanzen behandelten Nacktmäusen	76
4. DISKUSSION	80
4.1 Steroidhormonrezeptoren und Östrogenbiosynthese im Endometrium von gesunden und an Endometriose erkrankten Frauen	80
4.2 Expression von Steroidhormonrezeptoren und Enzymen des Steroidmetabolismus in humanem Endometrium kultiviert in der Nacktmaus	84
4.3 Modulation der Transkription Östrogen-metabolisierender Enzyme in ektopen endometrialen Läsionen nach Substitution mit Pharmaka	89
4.3.1 Effekt von bekannten Pharmaka auf Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierende Enzyme in humanem Endometrium kultiviert in Nacktmäusen	89
4.3.2 Einfluss von neu entwickelten 17 β HSD-1 Inhibitoren auf humanes Endometrium im Nacktmausmodell	99
4.4 Schlussfolgerungen	100
4.5 Zusammenfassung	101
5. LITERATUR	103

1. Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der Endometriose

Bei der Endometriose handelt es sich um das Vorkommen von endometrialem Drüsen- und Stromagewebe außerhalb des Cavum uteri, die erstmals bereits vor mehr als 300 Jahren als peritoneale Geschwüre auf der Oberfläche der Blase, des Darms und des Uterus (Shroen 1690) beschrieben wurden. Diese meist chronisch verlaufende Erkrankung tritt bei ca. 10-15% aller Frauen vornehmlich in der reproduktiven Lebensphase auf (Nothnick & D'Hooghe 2003). Es gibt Schätzungen, wonach bis zu 50% dieser Altersgruppe eine Endometriose entwickeln (Wheeler 1989). Bei annähernd 60% aller Patientinnen mit Fertilitätsproblemen konnte laparoskopisch eine Endometriose nachgewiesen werden (Ledger 1999). Die Endometriose kann zu reduzierter Fertilität und Schmerzen unterschiedlicher Intensität führen (Berkley et al. 2005). Es werden makroskopisch zwei Krankheitsbilder unterschieden: ovarielle und peritoneale Endometriose (Donnez et al. 1992; Donnez et al. 2002; Somigliana et al. 2004).

1.1.1 Theorien zur Entstehung der Endometriose

Es wurden verschiedene Theorien zu der Entstehung von Endometriose aufgestellt (Witz 2002):

Bei der Coelom-Metaplasie Theorie wird angenommen, dass die Endometriose durch Metaplasie von mesothelialen peritonealen und ovariellen Zellen entsteht (Ridley 1968). Ein Argument für diese Theorie ist das, wenn auch seltene, Auftreten von Endometriose bei Östrogen-behandelten Männern (Pinkert et al. 1979; Schrodtt et al. 1980). In Erweiterung der Metaplasie-Theorie geht die Induktionstherapie davon aus, dass menstruelles Endometrium Substanzen produziert, die die Entstehung von endometriotischen Läsionen im Peritoneum induzieren (Witz 2002). Die „embryonic cell rest theory“ besagt, dass Endometriose von embryonalen Stammzellen ausgeht, die unter Stimulation in funktionelles Endometrium differenzieren (Von Recklinghausen 1896; Russell 1899). Durch diese Theorie könnte ebenfalls zu erklären sein, dass Endometriose auch im Retroperitoneum und an Orten, die nicht direkt am Peritoneum lokalisiert sind, entstehen kann

(Halban 1924). Sampson (1925) vermutete, dass die Bildung einer Endometriose aufgrund der Verbreitung von endometrialen Zellen durch Blut- oder Lymphe erfolgen kann. Eine starke lymphatische Kommunikation konnte zwischen Uterus, Ovarien, Eileiter, Becken- und vaginalen Lymphknoten, Nieren und Nabel beobachtet werden (Schenken 1989). Durch diese Theorie kann das seltene Auftreten von Endometrium in Knochen, Muskeln, peripheren Nerven und im Gehirn erklärt werden. Inzwischen geht man davon aus, dass je nach Art der Endometriose eine unterschiedliche Entstehung verantwortlich ist (Nisolle & Donnez 1997). Die ovarielle Endometriose ist durch zystische Veränderungen im Bereich der Ovarien charakterisiert. Diese Zysten werden auch aufgrund ihrer Füllung mit dunklem, rot-braunem Blut als Schokoladenzysten bezeichnet und können mehrere Zentimeter groß werden (Schweppe 2002; Leidenberger et al. 2004). Man geht davon aus, dass die Entstehung der ovariellen Endometriose als Ergebnis einer Coelom-Metaplasie aus eingestülptem ovariellen Epithel resultieren kann.

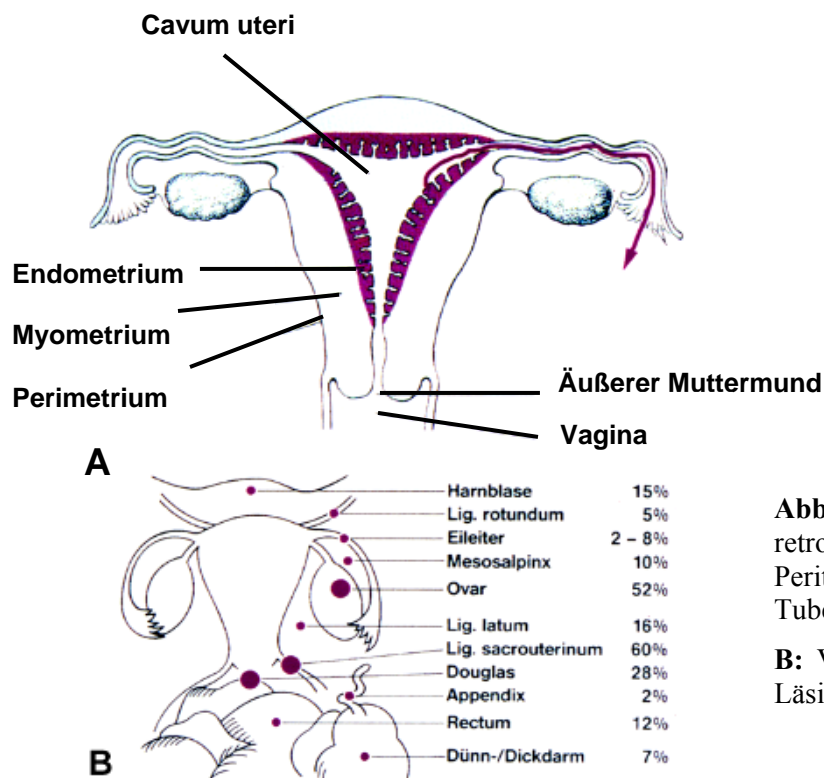


Abb. 1.1 A: Schematische Darstellung der retrograden Menstruation durch die Eileiter in die Peritonealhöhle (Pfeil). Dargestellt sind Uterus, Tuben und Ovarien.

B: Verteilungshäufigkeit von endometriotischen Läsionen im Bauchraum (Schweppe 1989).

Für die Entstehung der peritonealen Endometriose ist die Implantationstheorie, auch Sampson's Theorie genannt, die meist akzeptierte Theorie. Es wird angenommen, dass endometriales Gewebe durch retrograde Menstruation durch die Eileiter in die Körperhöhle gelangt, dort ans Peritoneum adhärirt und proliferiert (Sampson 1927). Diese Theorie wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Menstruationshäufigkeit und -stärke mit dem Auftreten einer Endometriose korreliert (D'Hooghe et al. 1996). Zudem ist die häufigste Ansiedlung von endometriotischen Läsionen im Douglas-Raum zu finden, der anatomisch den tiefsten Punkt des Peritonealraumes darstellt. Durch die Implantationstheorie wird die Entstehung der peritonealen Endometriose erklärt (Abb.1.1 A) (Nisolle & Donnez 1997). Maligne Veränderungen der Endometriose sind mit 0,7-1% der Fälle relativ selten. In 80% dieser Transformationen sind Endometriosen des Ovars für die Veränderung verantwortlich (Busacca & Vignali 2003).

1.1.2 Die peritoneale Endometriose

Da alle Frauen eine retrograde Menstruation aufweisen, aber nur ca. 10% eine Endometriose entwickeln, könnte die Ursache der Entstehung der Endometriose in einem nicht adäquat differenzierten Endometrium liegen (Halme et al. 1984; Liu & Hitchcock 1986). Zudem können Defekte im zellulären Immunsystem der betroffenen Frauen für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich sein. So können bei Frauen mit Endometriose Adhäsionsmoleküle die Aktivität der natürlichen Killerzellen behindern (Fukaya et al. 1999).

Die peritoneale Endometriose erscheint sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch als sehr heterogen. Die Läsionen variieren in Form und Farbe und haben einen Durchmesser von 1-4 mm (Abb. 1.2). Sie können unterschiedlich differenziert sein und hochdifferenzierte Drüsen sowie Stroma aufweisen, die während des Menstruationszyklus ähnliche Veränderungen durchlaufen wie das eutope Endometrium. Die Herde erscheinen als rote, schwarze und weiße Läsionen, wobei die roten mitotisch und parakrin aktiven, hypervaskularisierten Läsionen als das erste Stadium der Endometriose angesehen werden (Nisolle et al. 1993; Donnez et al. 2002). Die Vaskularisierung erscheint vor allem an der Oberfläche des Implantates und im umgebenden Peritoneum was annehmen lässt, dass die Läsionen die Angiogenese im umgebenden Gewebe induzieren (Wiegerinck et al. 1993; Kokorine et al. 1997). Die Läsionen zeigen eine Expression

von Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren wie Cadherinen, die diese Angiogenese vermitteln (Chen et al. 2002; Schweppe 2002).

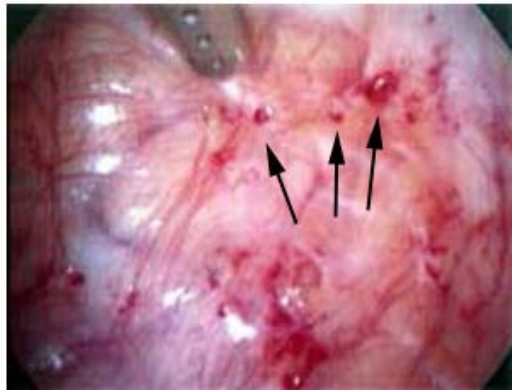


Abb. 1.2: Laparoskopische Darstellung von roten peritonealen endometriotischen Läsionen (s. Pfeile) am Darm.

Das Bild wurde folgender Internetseite entnommen:
<http://frauenheilkunde.insel.ch/endometriosesprechst.html>

Durch inflammatorische Reaktionen wird eine Vernarbung der roten Läsionen induziert, durch die diese eingeschlossen werden und nach einiger Zeit aufgrund von intra-luminalen Ablagerungen in schwarze und weniger aktive Läsion übergehen (Donnez et al. 2002). Die wenig vaskularisierten, mitotisch nicht aktiven weißen Läsionen gelten als ein Ruhestadium der Erkrankung (Nisolle et al. 1993).

Die peritonealen Endometrioseherde treten bei ca. 60% der Endometriose-Patientinnen an den Ligamenta sacrouterina und bei 52% der Fälle am Ovar auf. Oftmals sind sie aber auch im Douglas-Raum, an der Harnblase, an den Ligamenta lata und am Rektum lokalisiert (Schweppe 1989) (Abb. 1.1 B).

1.1.3 Klinische Manifestation der Endometriose

Das Krankheitsbild der Endometriose führt zu gravierenden klinischen Symptomen. Ein klassisches Symptom der Endometriose ist die Dysmenorrhoe (starke menstruelle Schmerzen), die die Mehrheit aller von Endometriose betroffenen Frauen aufweist. Dyspareunie (Unterleibsschmerzen während des Koitus), chronische Unterleibsschmerzen, perimenstruelle Schmerzen und Beckenschmerzen sowie schmerzhafte Defäkation (Schweppe 1989; Schweppe

1995; Leidenberger et al. 2004; Berkley et al. 2005) sind weitere Beschwerden. Charakteristisch ist, dass sich die Symptome zur Menstruation hin verstärken. Zudem wurden Verwachsungen, Vernarbungen und Zystenbildungen im Bereich des kleinen Beckens beschrieben (Leidenberger et al. 2004). Es gibt jedoch auch Frauen, die keine Symptome zeigen, weshalb der Anteil der an Endometriose erkrankten Frauen nur geschätzt werden kann. Es existiert zudem keine Korrelation zwischen dem Grad der Endometriose und dem Ausmaß der empfundenen Schmerzen.

Darüber hinaus weist das Auftreten der Endometriose eine Korrelation zur Infertilität auf. Bei bis zu 60% der Frauen, die sich aufgrund von Fertilitätsproblemen einer Laparoskopie unterziehen, wird eine Endometriose diagnostiziert (Ledger 1999; Hart 2003), und fast jede zweite Frau mit Endometriose ist von Sterilität betroffen (Strowitzki et al. 2003). Die genaue Ursache der reduzierten Fertilität bei Endometriose-Patientinnen ist bisher ungeklärt. Zum einen können durch Adhäsionen mechanisch Eisprung und Eitransport gestört sein. Es gibt zudem Annahmen, dass Endometriose als eine chronisch entzündliche Erkrankung angesehen werden kann (Gleicher 1992; Ryan & Taylor 1997). So konnten in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen erhöhte Level verschiedener Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und angiogenetischen Faktoren nachgewiesen werden (Ryan & Taylor 1997). Bei Entzündungen werden zudem erhöhte Konzentrationen an Prostaglandinen aus Makrophagen freigesetzt, was bei Frauen mit Endometriose zu einer erhöhten Konzentration von Prostaglandinen in der Peritonealflüssigkeit führt, die einen schädlichen Einfluss auf die Ovulation haben könnten (Andersson 1993). Auch gibt es bei diesen Patientinnen Hinweise auf eine reduzierte Eizellen- und Embryonen-Qualität. Für eine erfolgreiche Implantation, Schwangerschaft und Geburt ist neben der Qualität des Embryos die Fähigkeit des Endometriums, Einnistung und Entwicklung des Embryos zu ermöglichen, von entscheidender Bedeutung (Garrido et al. 2002). Es gibt Hinweise darauf, dass Veränderungen im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose für die Subfertilität verantwortlich sein können. Einige Untersuchungen konnten z.B. bereits eine veränderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie die der Integrine (Lessey & Young 1997; Regidor et al. 1998; Garcia-Velasco & Arici 1999) in den Endometrien von erkrankten Patientinnen aufzeigen.

1.2 Diagnose und Therapieansätze bei Endometriose

Die eindeutige Diagnose der Endometriose kann nach wie vor nur durch direkte Betrachtung des Bauchraums der Patientin, z.B. mit Hilfe einer Laparoskopie, erfolgen (Scarselli et al. 2005). Nur so ist es möglich, auch milde Formen der Endometriose zu erfassen. Bei der Laparoskopie werden Biopsien der Läsionen entnommen, die histologisch auf das Vorhandensein von endometrialem Stroma und Drüsen untersucht werden (Revelli et al. 1995). Ist die Durchführung einer Laparoskopie nicht möglich, kann eine Laparotomie notwendig werden, bei der der Bauchraum chirurgisch geöffnet wird (Hucke & Distler 1989).

Zur Behandlung der Endometriose hat sich in den meisten Fällen eine chirurgische Entfernung der Läsionen in Kombination mit einer medikamentösen Therapie etabliert. Die hormonelle Behandlung der Endometriose beruht auf der Beobachtung, dass sich die Erkrankung während einer Amenorrhoe, besonders während der Schwangerschaft, bessert oder ganz zurückbildet. Indiziert ist sie bei Frauen mit Kinderwunsch, präoperativ und bei unvollständiger operativer Entfernung zur Nachbehandlung mit dem Ziel der Vermeidung von Rezidiven oder Progredienz.

Da es sich bei der Endometriose um eine Östrogen-abhängige Erkrankung handelt (Evans et al. 1999; Kitawaki et al. 1999), zielen die meisten medikamentösen Therapieansätze auf das Erreichen eines hypoöstrogenen Zustandes, der durch Suppression der Freisetzung von hypophysären Gonadotropinen eine Atrophie des eutopen sowie auch des ektopen Endometriums erzeugt. Nachfolgend sind die gängigen medikamentösen Therapieansätze aufgeführt.

1.2.1 Etablierte Therapiewege

Zur Therapie der Endometriose etablierte Substanzen sind Danazol, Ovulationshemmer, Progestine, Antiprogestine und GnRH-Agonisten, die nachfolgend beschrieben werden.

Danazol

Seit der Einführung von Danazol 1971 (Greenblatt et al. 1971) wird es häufig zur Therapie der Endometriose eingesetzt. Es handelt sich um ein Derivat des synthetischen Steroids 17α -Ethinyl-Testosteron mit androgen-anabolen, jedoch auch anti-androgenen, progestagenen, anti-progestagenen, östrogenen und anti-östrogenen Eigenschaften (FachInfo-Service, Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V., Aulendorf, Deutschland) (Strowitzki et al. 2003). Durch Reduktion der hypothalamischen GnRH-Pulsfrequenz und Unterdrückung der mittzyklischen FSH- und LH-Spitzen führt es adrenal und ovariell zu einer reduzierten E_2 - und P-Synthese. Dies führt u.a. zu einer Amenorrhoe, zur Anovulation und zu einem relativen Östrogenmangel. Im Blut verdrängt Danazol Testosteron aus seiner Bindung an das Sexualhormon-bindende Globulin (SHGB). Die Behandlung umfasst üblicherweise 6 Monate und ist mit starken androgenen Nebenwirkungen verbunden (Strowitzki et al. 2003).

Unter der Therapie mit Danazol kommt es zu einer Regression und Atrophie der ektopen Herde mit nachfolgender Resorption und bindegewebigen Ersatz. Die Atrophie und Regression werden durch einen hypoöstrogenen Zustand, den Anstieg des freien Testosterons, eine Interaktion mit Steroidhormonrezeptoren und durch den direkten Einfluss von Danazol bedingt. Eine neue Verabreichungsart von Danazol als Vaginalring ist viel versprechend in der Reduktion von Dysmenorrhoe und Dyspareunie, vor allem bei Frauen mit tief infiltrierender Endometriose. Während der Therapie konnte Danazol nicht im Serum nachgewiesen werden und es traten keine Nebenwirkungen auf. Siebzehn von 31 Frauen wurden während der Behandlung schwanger (Fedele & Berlanda 2004).

Ovulationshemmer

Ovulationshemmer werden bei Endometriose-Patientinnen häufig zur Unterdrückung von Dysmenorrhoe eingesetzt. Die ovulations- und proliferationshemmende Wirkung auf das Endometrium scheint aber auch für die Prävention der Endometriose eine Rolle zu spielen. Ovulationshemmer zeichnen sich durch gute Verträglichkeit und geringe Nebenwirkungsrate (Gewichtszunahme, Kopfschmerzen) aus.

Progestine

Progestine wurden vor allem in den 60er Jahren in der Behandlung der Endometriose eingesetzt. In den letzten Jahren haben sie jedoch wieder an Bedeutung gewonnen. Bisher wurden in der Behandlung der Endometriose unterschiedliche Progestine verwendet, es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass sich eine Substanz besser eignet als andere. Aufgrund ihrer Effektivität und guten Verträglichkeit eignen sie sich möglicherweise für eine Langzeitbehandlung. Zudem sind sie preiswert und können als Depot verabreicht werden. Für Frauen mit Kinderwunsch sind Progestine nicht empfehlenswert, da es nach der Therapie zu einer Verzögerung der Ovulation kommt (Fedele & Berlanda 2004). Zur Behandlung der Endometriose werden z.B. Dydrogesteron (Duphaston®) und Medroxyprogesteronacetat (MPA) verabreicht. Bezüglich der Dysmenorrhoe wird eine Erfolgsrate von 80% angegeben, hinsichtlich der Rückbildung der Endometrioseherde 50%. Die Nebenwirkungen sind vielfältig und substanzabhängig, so treten z.B. Zwischenblutungen und Gewichtszunahme auf. Dydrogesteron wird erfolgreich zur postoperativen Behandlung (Makhmudova et al. 2003) und zur Therapie von milder Endometriose (Overton et al. 1994) sowie zur Behandlung von Infertilität (Tumasian et al. 2001) eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass über 4 Monate verabreichtes MPA über anti-inflammatorische Aktivität verfügt, die die Peritonealflüssigkeit, die Anzahl der Leukozyten und den Erkrankungsstatus reduzieren (Haney & Weinberg 1988).

Antiprogestine

Antiprogestine hemmen die Ovulation, induzieren einen relativen Östrogenmangel und hemmen die Proliferation, so dass ihre Wirkung mit der der Gestagene vergleichbar ist. Die Induktion des medizinischen Schwangerschaftsabbruches in der Frühschwangerschaft war die Hauptanwendung von Mifepriston (RU-486) (Chabbert-Buffet et al. 2005), was diese Substanz zum am besten untersuchten Antiprogestin macht (Han & Sidell 2003). Das negative Image von Mifepriston in Bezug auf Abtreibungen hat die Beteiligung von großen Pharmakonzernen in der Entwicklung von Antiprogestinen wie auch von selektiven Progesteronrezeptor Modulatoren (SPRMs), die

gemischte Agonist-Antagonist Eigenschaften haben, relativ gering gehalten. Viele Antiprogesterine und SPRMs haben dabei anti-proliferative Effekte im Endometrium, was eine Anwendung bei Myomen und Endometriose rechtfertigt (Chabbert-Buffet et al. 2005).

GnRH-Agonisten

Die häufigste medikamentöse Behandlung der Endometriose erfolgt durch GnRH-Agonisten. Diese bewirken durch eine Desensitivierung der Hypophyse (Rezeptorblockade) eine reversible ovarielle Suppression, wodurch eine Regression und Atrophie der Endometrioseherde induziert wird. Die Hauptproblematik der Nebenwirkungen ist die signifikante Abnahme der Knochendichte von 1% pro Monat (Pickersgill 1998). Die Behandlung führt zusätzlich längerfristig zu gravierenden Nebenwirkungen, wie z.B. Hitzewallungen und ein erhöhtes Risiko für Herzkrankheiten, weshalb sie meistens auf 6 Monate begrenzt wird (Fedele & Berlanda 2004). Nach einer 6-monatigen Therapie kann es bis zu 2 Jahre dauern, bis die ursprüngliche Knochendichte wieder hergestellt ist (Paoletti et al. 1996). Die durch den Östrogenmangel bedingten Nebenwirkungen können jedoch durch eine begleitende niedrigdosierte Hormonsubstitution reduziert werden (Strowitzki et al. 2003).

1.2.2 Neue Therapiewege

Als neue Therapiewege werden die Behandlung mit Aromatasehemmern, GnRH-Antagonisten, selektiven Östrogenrezeptor Modulatoren (SERMs), „non-steroidal anti-inflammatory drugs“ (NSAIDs) und selektiven Progesteronrezeptormodulatoren (SPRMs) angesehen, die im Folgenden kurz beschrieben werden.

Aromatasehemmer

Kürzlich haben sich in Phase II Studien Aromatasehemmer zur Behandlung von Endometriose bei pre- und postmenopausalen Frauen als besonders geeignet erwiesen. Diese Substanzen

blockieren die Herstellung extra-ovarieller Östrogene in der Haut, im Fettgewebe und in endometriotischen Läsionen, jedoch nicht die ovarielle Funktion (Bulun et al. 2005). Die Nebenwirkungen von Aromatasehemmern bestehen aus Schwäche, Kopfschmerz, Hitzewallungen und Übelkeit, beinhalteten aber in den meisten Fällen keinen Verlust der Knochenmasse (Amsterdam et al. 2005; Bulun et al. 2005). Die Verabreichung von Aromatasehemmern in Kombination mit einem oralem Kontrazeptivum oder Progestin hat sich effektiv in der Behandlung von Patientinnen gezeigt, die sich als resistent gegenüber den herkömmlichen Endometriose-Therapien zeigten (Ailawadi et al. 2004; Amsterdam et al. 2005). In einer Placebo-kontrollierten Studie erzielten Aromatasehemmer in Kombination mit einem GnRH-Analogen nach 24 Monaten Therapie einen besseren Schutz vor erneutem Auftreten von Endometriose-bedingten Schmerzen im Vergleich zur alleinigen Verabreichung des GnRH-Analogons (Soysal et al. 2004). Die Behandlung mit Aromatasehemmern stellt so signifikante klinische Vorteile im Gegensatz zu bisherigen Behandlungen und Rückfallraten bei Endometriose dar (Bulun et al. 2005). Die Aromatasehemmer der dritten Generation, Anastrozole und Letrozole, wurden bisher ebenfalls erfolgreich zur Behandlung von Endometriose in prä- und postmenopausalen Frauen angewandt (Takayama et al. 1998; Ailawadi et al. 2004; Razzi et al. 2004; Shippen & West 2004; Soysal et al. 2004; Amsterdam et al. 2005). In vier verschiedenen Phase II Studien wurde ein Aromatasehemmer jeweils zusammen mit einem GnRH-Agonisten, einem Progestin, P und in Kombination mit oralem Kontrazeptiva verabreicht (Ailawadi et al. 2004; Shippen & West 2004; Soysal et al. 2004; Amsterdam et al. 2005). Diese Studien zeigten eine signifikante Reduktion von Unterbauchschmerzen bei den behandelten Patientinnen. Eine Studie zeigte nach gleichzeitiger Verabreichung von Letrozol und dem Progestin Norethindron Acetat laparoskopisch die Eliminierung von sichtbaren Läsionen zusammen mit einer signifikanten Reduktion des Schmerzes (Ailawadi et al. 2004).

GnRH-Antagonisten

GnRH-Antagonisten wie z.B. Cetrorelix (Cetrotide®) erzielen eine sofortige Suppression der gonadotropen Zellen der Hypophyse durch eine kompetitive Rezeptorblockade (Küpker 2002). Die Unterdrückung erfolgt bereits in den ersten Stunden nach Applikation ohne den bei GnRH-

Agonisten bekannten Flare-up-Effekt. Nebenwirkungen sind in erster Linie lokale Reaktionen an der Injektionsstelle und eine ovarielle Hyperstimulation. Ein möglicher großer Vorteil gegenüber den GnRH-Agonisten liegt im Erhalt eines basalen Östrogenspiegels, sodass meist auf eine Add-Back-Therapie verzichtet werden kann (Küpker 2002). Die Anwendung von Cetrorelix in der in vitro Fertilisation (IVF) verhindert einen LH Surge. Besonders geeignet ist die Substanz vor allem für die Induktion der Ovulation durch LHRH oder eines seiner Agonisten anstelle von HCG, was vor allem für Patientinnen mit ovarielltem Hyperstimulationssyndrom oder polyzystischen Ovar geeignet ist (Felberbaum & Diedrich 1999). In Phase II Studien wurde Cetrorelix bei verschiedenen Indikationen getestet. Eine Pilotstudie zur Behandlung von Myomen zeigte effektive Reduktion der Myomengröße mit einer kürzeren Behandlungsdauer im Vergleich zu LHRH-Agonisten ohne hormonelle Kastration (E_2 im Serum < 50 pg/ml) (Gonzalez-Barcena et al. 1997).

SERMs

Das SERM Tamoxifen, das bei der Brusttumorthherapie erfolgreich eingesetzt wird, ist zur Behandlung der Endometriose ungeeignet, da gezeigt werden konnte, dass die Gabe von Tamoxifen zur Persistenz und zur Reaktivierung von Endometriosen beiträgt (Rose et al. 2000) weil es eine östrogene Wirkung auf das Endometrium hat. Für neuere SERMs wie Raloxifen liegen keine Daten bei Endometriose-Patientinnen vor.

NSAIDs

Patientinnen mit Unterbauchschmerzen ohne Kinderwunsch bekommen eine medikamentöse Therapie in Form von „nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)“ und Cyclooxygenase-2 (COX-2)-spezifischen Inhibitoren zur Schmerzbehandlung. Aufgrund des erhöhten Abort-Risikos sollten diese Substanzen bei Frauen mit Kinderwunsch nicht angewandt werden (Li et al. 2003).

SPRMs

SPRMs stellen eine neue Klasse von PR-Liganden dar, die gewebespezifisch progesteronagonistische, -antagonistische oder beide Effekte vermitteln. Asoprisnil ist das erste SPRM, welches in klinischen Studien zur Behandlung von uterinen Fibroiden und Endometriose eingesetzt wird. In Primaten hat die Behandlung eine anti-proliferative Wirkung auf das Endometrium und das Brustgewebe. Bei Behandlung von Endometriose reduziert Asoprisnil nicht-menstruelle Schmerzen und Dysmenorrhoe (Chwalisz et al. 2005).

Die bisherigen therapeutischen Ansätze stellen jedoch keine ursächliche Therapie dar, sondern sind lediglich auf die Behandlung der klinischen Symptome ausgerichtet. Zudem führen die meisten der aktuell eingesetzten Behandlungsmethoden zu einer sehr hohen Rezidivrate: unabhängig von der Art der Primärtherapie liegt die Rückfallhäufigkeit nach 5 Jahren zwischen 20 und 80% (Waller & Shaw 1993). Zudem sind die aktuellen Behandlungsmethoden bei Patientinnen mit Kinderwunsch nur begrenzt anwendbar, da sie die Ovulation inhibieren und zur Amenorrhoe führen. Eine optimale Therapie würde neben der Entfernung des ektopen endometrialen Gewebes auch einen Rückfall verhindern, ohne die Fertilität der Frau zu beeinflussen (Somigliana et al. 1999; Fedele & Berlanda 2004). Somit besteht ein dringender Bedarf, neue Medikamente für effektivere, lokal wirkende Therapieansätze zu entwickeln.

1.3 Östrogen-metabolisierende Enzyme als therapeutische Targets

Bei der Endometriose handelt es sich um eine Östrogen-abhängige Erkrankung. Daher könnten neue Therapieansätze auf eine spezifische Regulation der Östrogen-metabolisierenden Enzyme zielen. Wie bereits in Kapitel 1.2.2 dargestellt, könnte ein Zielenzym die Aromatase sein. Im Folgenden werden zunächst die an dem Östrogenmetabolismus beteiligten Faktoren vorgestellt.

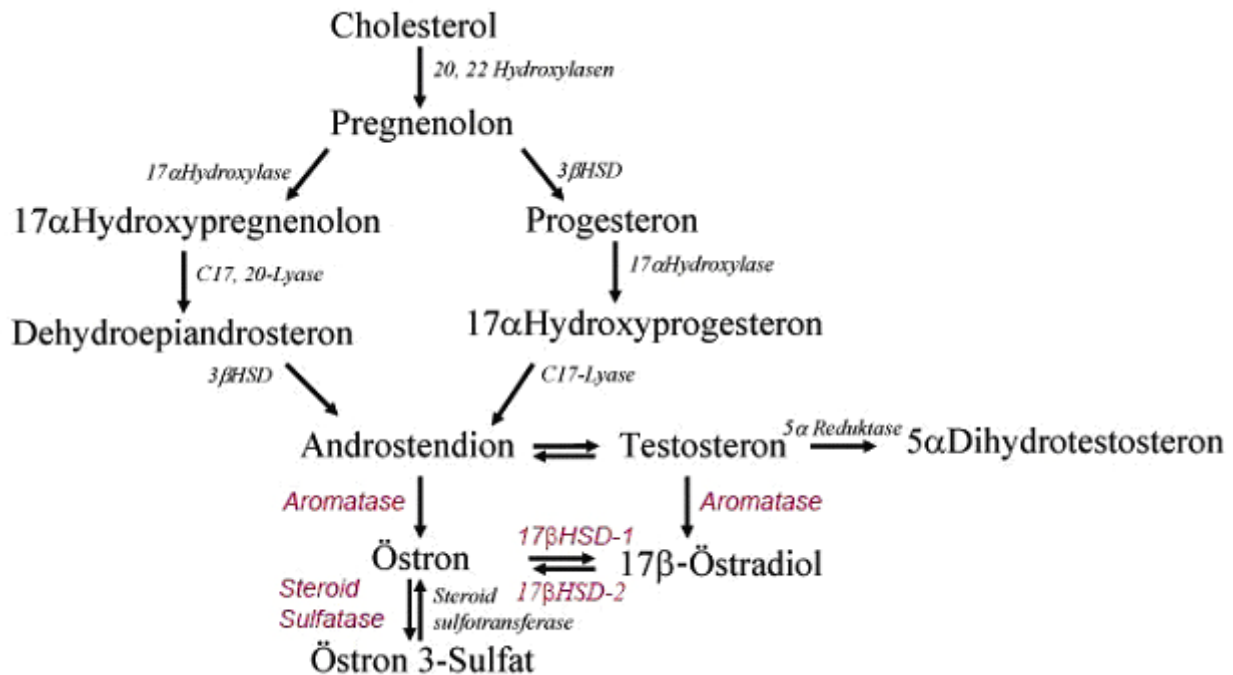


Abb. 1.3: Schematische Darstellung über die Biosynthese der Sexualsteroidhormone. Grafik erstellt in Anlehnung an: Leidenberger et al. (2004) und Huber (1998)

Die unmittelbare Vorstufe der Steroidbiosynthese ist das Cholesterol (Abb. 1.3). Aus dem Blut gelangt es durch ein Trägerlipoprotein ins Zellinnere, wo durch Abspaltung einer Seitenkette Pregnenolon entsteht. Die an der Steroidhormonsynthese beteiligten Enzyme sind entweder Dehydrogenasen oder Cytochrom P450 enthaltende mischfunktionelle Oxygenasen. Dehydrogenasen reduzieren oder oxidieren Steroide um 2 Elektronen, Cytochrom P450 Enzymreaktionen bewirken am Steroidmolekül mit Hilfe von NADPH den Einbau von Sauerstoff. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Steroidbiosynthese ist der Transport des Cholesterols von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran. Die Synthese der Steroide findet in Theka- und Follikelepithelzellen sowie im Corpus luteum des Ovars statt, die parakrin kooperieren. Die wichtigsten Proteine für die Umwandlungen des Cholesterols in Östrogene sind die Aromatase und das „steroidogenic acute regulatory protein“ (StAR). StAR erleichtert den Eintritt von Cholesterol aus dem Cytosol in die Mitochondrien, was als ein limitierender Schritt des Prozesses angesehen wird (Stocco 2002). Der zweite limitierende Schritt ist die Umwandlung von Androstendion zu Östron durch die Aromatase. Dieses Enzym

katalysiert den letzten Schritt zur Umwandlung in Östrogene und ist im endoplasmatischem Retikulum von Östrogen-produzierenden Zellen lokalisiert (Sebastian & Bulun 2001).

Alle Steroidverbindungen, die zwischen den C-Atomen 5 und 6 eine Doppelbindung haben, werden als Δ_5 -Steroide bezeichnet. Sie sind biologisch wenig oder nicht aktiv und können durch Verlagerung der Doppelbindung durch das Enzym Isomerase auf C-Atom 4/5 aktiviert werden, wodurch Δ_4 -Steroide entstehen. Diese Umwandlung ist ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der biologischen Aktivität der Steroide. Alle biologisch aktiven C_{21} und C_{19} -Steroide sind Δ_4 -Steroide (z.B. P oder Testosteron). Östrogene haben im Ring A einen Benzolring. Das Wesentliche der Synthese von Östrogenen aus Androgenen besteht in der Bildung des Benzolrings. Dieser Vorgang nennt sich Aromatasierung und wird von dem Enzym Aromatase durchgeführt. Die natürlichen Östrogene des Menschen sind Östron, E_2 (das biologisch eigentlich aktive Östrogen) und Östriol. Zu ihrer Bildung sind C_{19} -Steroide (Androgene und ihre Vorstufen) erforderlich. Durch die Umwandlung des A-Ringes in einen Benzolring entfällt die Methylgruppe am Kohlenstoffatom 19. E_2 liegt im menschlichen Organismus fast ausschließlich als 17β -Östradiol vor und hat vor allem aufgrund seiner proliferativen Wirkung klinische Relevanz (Huber 1998; Leidenberger et al. 2004).

Die Enzymgruppe der 17β Hydroxysteroid Dehydrogenasen katalysiert die Umwandlung von Östron in E_2 und die Umwandlung von Androstendion in Testosteron (bzw. jeweils die Gegenreaktionen). Bis heute wurden mehr als 10 verschiedene 17β HSD Enzyme mit einer Steroid-metabolisierenden Fähigkeit charakterisiert (Mindnich et al. 2004). Möglicherweise erklärt die Fähigkeit der Enzyme, die intrazelluläre Konzentration an Steroiden zu kontrollieren, die Ausbildung zahlreicher Isoenzyme mit unterschiedlicher zellspezifischer Ausbildung, Substratspezifität und Regulationsmechanismen (Peltoketo et al. 1999). Der Reaktionsmechanismus der 17β HSD Isoformen ist konserviert und besteht bei der Ketosteroid Reduktion (z.B. Umwandlung von Östron in biochemisch aktives E_2) aus einem Nikotinamidring und einem katalytischen Tyrosin. Für die Reaktion wird der Kofaktor NADPH benötigt (Penning 2003). Im humanem eutopen Endometrium konnte mRNA von 17β HSD-1 und -2 in den Drüsenepithelzellen nachgewiesen werden, wobei 17β HSD-2 stark gegen Zyklusende in der Expression gesteigert wird (Casey et al. 1994; Mustonen et al. 1998).

In den endometriotischen Läsionen wurden im Vergleich zum eutopen Endometrium zahlreiche molekulare Abweichungen detektiert, die zu einer erhöhten lokalen Konzentration von E_2 führen. So konnte im gesunden eutopen Endometrium keine Enzymaktivität von Aromatase, dem Schlüsselenzym der Biosynthese von Östrogenen, nachgewiesen werden, während es in den endometriotischen Läsionen zu einem gesteigerten Expressionslevel kommt (Bulun et al. 2004). Zusätzlich konnte aber auch eine veränderte Ausbildung der Enzyme 17 β HSD-1- und -2 in den endometriotischen Läsionen beobachtet werden. Während 17 β HSD-1 in den Läsionen exprimiert wird (Labrie et al. 1989; Zeitoun et al. 1998), konnte 17 β HSD-2 weder auf mRNA- noch auf Proteinebene detektiert werden (Zeitoun et al. 1998). Zirkulierendes Androstendion kann so durch Aromatase und 17 β HSD-1 in E_2 umgewandelt werden, während die Umwandlung des E_2 in das biochemisch weniger potente Östron kaum effizient wäre. So kann es innerhalb der endometriotischen Läsionen zu einer gesteigerten lokalen Synthese von E_2 kommen, die von der ovariellen Östrogensynthese unabhängig ist (Abb. 1.4).

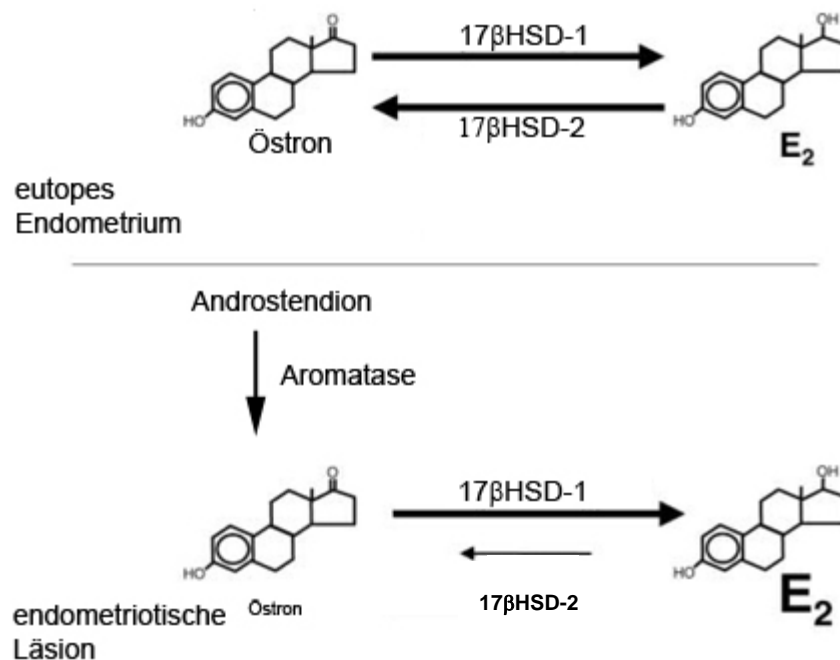


Abb. 1.4: Fehlerhafte Inaktivierung von E_2 in endometriotischen Läsionen: Durch verstärkte Aktivität des Enzyms Aromatase kommt es zur Produktion von Östron, welches durch 17 β HSD-1 zu E_2 reduziert wird. Im eutopen Endometrium wird E_2 durch das Enzym 17 β HSD-2 mittels Umwandlung in Östron inaktiviert. In endometriotischen Läsionen wird E_2 durch die fehlende Ausbildung von 17 β HSD-2 nicht metabolisiert, was zu erhöhten lokalen Konzentrationen dieses potenten Östrogens führt. Grafik erstellt in Anlehnung an: Bulun et al. (2000).

Durch PGE_2 erfolgt eine Stimulation der Aromatase Aktivität in den Läsionen welche die Cyclooxygenase-2 Aktivität und somit die Erhöhung von PGE_2 fördert. Zusätzlich ist innerhalb der Läsionen die Bildung von Östron aus E_2 durch das Enzym $17\beta\text{HSD-2}$ gehemmt (s.o.). Die Inaktivierung von E_2 wird demnach verhindert und eine mögliche Insensitivität der Läsionen gegenüber P gefördert.

Ein weiteres Schlüsselenzym der Steroidbiosynthese ist die Steroid Sulfatase (STS), die sulfatisierte Steroide in biologisch aktive und freie Steroide umwandelt. So wird z.B. Östron 3-Sulfat in Östron umgewandelt, welches durch $17\beta\text{Hydroxysteroid Dehydrogenasen}$ zu aktivem E_2 katalysiert werden kann. STS wird im Endometrium und in zahlreichen weiteren Organen exprimiert. Es konnte eine starke Expression von STS in Cumulus Zellen von Patientinnen mit Endometriose nachgewiesen werden (Yanaihara et al. 2005). Zusätzlich scheint STS eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs zu spielen (Suzuki et al. 2003). Somit konnte bei den Enzymen des Östrogenmetabolismus Aromatase, $17\beta\text{HSD-1/17}\beta\text{HSD-2}$ und STS eine unterschiedliche Expression im Endometrium bzw. in den Endometrioseherden bei Patientinnen mit Endometriose nachgewiesen werden. Diese Enzyme könnten somit als therapeutische Targets für neue medikamentöse Ansätze dienen. Eine Reduktion der lokalen E_2 -Produktion könnte z.B. durch Hemmung der Aromatase oder von $17\beta\text{HSD-1}$ erreicht werden. Aromatasehemmer werden bereits als Therapeutika zur Behandlung der Endometriose diskutiert (Ebert et al. 2005) und wurden in ersten Fallbeispielen bereits erfolgreich eingesetzt (Takayama et al. 1998; Amsterdam et al. 2005). Zusätzlich werden sie zur Zeit postmenopausalen Frauen verabreicht, um Hormonrezeptor positiven Brustkrebs, der nicht auf eine Behandlung mit Tamoxifen anspricht, zu behandeln (Goss & Strasser 2001; Strowitzki et al. 2003).

Als neue Therapeutika diskutiert werden zudem „selective intracrine modulators“ (SIMs), die eine gewebespezifische Hemmung von $17\beta\text{Hydroxysteroid Dehydrogenasen}$ bewirken (Penning 2003) und z.B. durch Hemmung von $17\beta\text{HSD-1}$ die Umwandlung von Östron in E_2 blockieren könnten.

1.4 Tiermodelle zur Untersuchung der Endometriose

Da die Entstehung der peritonealen Endometriose von der retrograden Menstruation abhängt, entwickeln nur menstruierende Affen und der Mensch spontan Endometriose (Story & Kennedy 2004). Aufgrund ethischer Überlegungen ist die Durchführung von Studien am Menschen nicht möglich. Die hohen Kosten und das geringe Vorkommen spontaner Endometriosen limitieren den Einsatz von Affen als Tiermodell (MacKenzie & Casey 1975; Fanton & Hubbard 1983).

Um weitere Informationen zu initialen Prozessen der Pathogenese dieser Erkrankung zu erlangen und um Therapeutika auf Effektivität zu testen, wurden daher verschiedene Modelle zur Untersuchung der Endometriose in Kaninchen, Ratten und Mäusen etabliert (Donnez et al. 1987; Awwad et al. 1999; Sharpe-Timms 2002). Hierbei können Uterusfragmente von einem Uterus-Horn autolog in die Peritonealhöhle transplantiert (Vernon 1990) oder von einer Donormaus zu einer Akzeptormaus transferiert werden (Somigliana et al. 1999). Die Verwendung von immundefizienten Mäusen erlaubt die Transplantation von humanem Gewebe (Xenotransplantation) anstelle autologer Transplantation. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl humanes proliferatives als auch sekretorisches Endometrium erfolgreich in Peritonealhöhle von immundefizienten SCID („severe combined immunodeficiency“) -Mäusen und athymischen Nacktmäusen transplantiert werden kann (Zamah et al. 1984; Awwad et al. 1999; Nisolle et al. 2000; Grümmer et al. 2001; Beliard et al. 2002; Hull et al. 2003). Hierbei ist die Entwicklung des humanen Endometriums im Nager weitgehend unabhängig von der Zyklusphase des Donorendometriums (Nisolle et al. 2000; Story & Kennedy 2004). Eine in vitro Vorbehandlung des Gewebes mit E₂ und P zeigte keinen Einfluss auf das Überleben des Endometriums in der Maus (Nisolle et al. 2000). Die Implantation des zerkleinerten endometrialen Gewebes erfolgt in die Peritonealhöhle oder in die Subkutis der Mäuse (Vernon 1990) und kann auf unterschiedliche Weise wie durch Minilaparotomie und anschließendes Einsetzen bzw. Annähen der Fragmente in die Peritonealhöhle (Grümmer et al. 2001) oder durch intraperitoneale bzw. subkutane Injektion erfolgen (Bruner et al. 1997; Matsuura-Sawada et al. 2005). Die Fragmente implantieren in das umliegende Gewebe und formen Endometriose-ähnliche Läsionen, die makroskopisch und histologisch mit ektopen humanen Läsionen vergleichbar sind (Zamah et al. 1984; Bergqvist et al. 1985; Zaino et al. 1985; Aoki et al. 1994; Bruner et al. 1997; Tabibzadeh et al. 1999; Nisolle

et al. 2000; Grümmer et al. 2001; Beliard et al. 2002; Bruner-Tran et al. 2002; Hull et al. 2003), über eine Sensitivität gegenüber verabreichten Steroiden (Zamah et al. 1984; Bruner et al. 1997; Bruner et al. 1999) und über eine Vaskularisierung (Grümmer et al. 2001; Hull et al. 2003) verfügen. Durch die Verwendung von humanem Gewebe ist das Nacktmausmodell für Endometriose somit zur Untersuchung von Therapeutika, die in der Endometriose eingesetzt werden sollen, besonders geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wurde das von Grümmer et al. (2001) etablierte Nacktmausmodell verwendet, in dem humanes Endometrium an das Peritoneum der Bauchwand angenäht wird. Dieses Modell ermöglicht eine fast 100%ige Wiederfindungsrate der implantierten Fragmente und es zeigte sich bereits nach 4 Tagen eine Angiogenese von Mausgefäßen in das humane Endometriumgewebe (Grümmer et al. 2001; Hull et al. 2003). Hierdurch wird gewährleistet, dass systemisch applizierte Substanzen in die ektopen Läsionen gelangen können. Daher scheint das Modell geeignet, die Wirkung von Substanzen auf die Expression von Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzymen in den kultivierten Fragmenten zu untersuchen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die lokale Expression und Regulation der Steroidhormonrezeptoren ER α und PR (A+B) sowie der Schlüsselenzyme der Östrogensynthese 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (HSD)-1 und -2, Aromatase und STS in humanem Endometrium, das in die Peritonealhöhle von Nacktmäusen implantiert wird, untersucht werden. Die Modulation dieser Parameter sollte unter Einwirkung bekannter und unbekannter Therapeutika getestet werden.

Um hierfür die geeignete Behandlung der Mäuse zu evaluieren, wurde die Expression der zu untersuchenden Parameter zunächst in humanem Endometrium nach Transplantation in unbehandelte und hormonbehandelte zyklische sowie hormonsubstituierte OVX Mäuse analysiert.

Zur Bestimmung eines geeigneten Zeitpunktes für die Untersuchungen zur Regulation der genannten Parameter sollte die Transkription der Steroidhormonrezeptoren und der E₂-konvertierenden Enzyme in dem in die Nacktmaus transplantierten humanem Endometrium über einen Zeitraum von 28 Tagen verfolgt werden. In dem so evaluierten Modell sollte dann die Wirkung von bekannten Pharmaka, die bereits zur Behandlung der Endometriose eingesetzt werden, sowie von neu synthetisierten Solvay Testsubstanzen analysiert werden. Als Wirkparameter sollte zum einen der Parameter Uterus- und Nebennierengewicht, Serumhormonwerte sowie Zyklusstadium der Mäuse untersucht, zum anderen der Effekt der applizierten Pharmaka auf die Transkription der Steroidhormonrezeptoren und Östrogen-metabolisierende Enzymen in den humanen ektopen endometrialen Läsionen analysiert werden. Um eine veränderte lokale Östrogenproduktion in den ektopen Läsionen zu detektieren, sollte die Genexpression von E₂-sensitiven Genen und die Proliferationsrate in den transplantierten Fragmenten untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Humanes Endometriumgewebe: Entnahme und Aufarbeitung

2.1.1 Eutopes Endometrium

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Endometriumgewebe stammt aus Hysterektomien bzw. Strichkürretagen von prämenopausalen Frauen im Alter zwischen 21 und 51 Jahren, die in der gynäkologischen Abteilung des Universitätsklinikums Essen (Leitung: Prof. Kimmig) durchgeführt wurden. Die Indikationen für die operativen Eingriffe waren ektope endometriotische Läsionen und/oder Ovarzysten, Uterus myomatosus, Fertilitätsprobleme, chronische Unterbauchschmerzen oder unregelmäßige Blutungen.

Die Zyklusbestimmung erfolgte durch die Anamnese und wurde histologisch nach den Kriterien von Noyes et al. (1950) sowie durch den Serumprogesteronwert verifiziert: Ein Serumprogesteronwert von 1,4 ng/ml wurde als Grenzwert für die Separation von Proliferations- und Sekretionsphase festgelegt. Lag der gemessene Progesteronwert darunter, befanden sich die Patientinnen definitionsgemäß in der Proliferationsphase, lag der Wert darüber, befanden sie sich in der Sekretionsphase. Weitere Informationen zur allgemeinen Anamnese sowie über vorherige Behandlungen, wie z.B. Medikamenteneinnahme vor dem Eingriff wurden den Patientinnenakten entnommen. Die Gewebeentnahme sowie die anschließende Verwendung zu Forschungszwecken wurden von der örtlich zuständigen Ethikkommission genehmigt und erfolgten mit Einverständnis der Patientinnen.

Insgesamt wurden Endometrien von 61 Patientinnen untersucht, 33 dieser Endometrien stammten von Patientinnen ohne Endometriose, 28 von Endometriosepatientinnen.

Die Gewebe wurden unmittelbar nach der Entnahme in kalte Moscona-Lösung (4°C) überführt und für alle weiteren Versuche in das Labor des Instituts für Anatomie gebracht.

Vor der Transplantation in die Nacktmaus wurde das Gewebe mit einem Skalpell in Fragmente von 1-3 mm Durchmesser geschnitten und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Von jedem Gewebe wurde ein Fragment zur RNA-Isolierung sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -

80°C bis zur Aufarbeitung gelagert. Für die morphologische Auswertung und die immunhistochemischen Färbungen wurde ein Gewebefragment für die Paraffineinbettung in 10% Formalin fixiert. Die Transplantation des übrigen Gewebes in die Nacktmaus erfolgte spätestens 3 Stunden nach Operation.

2.1.2 Endometriotische Läsionen

Bei Patientinnen mit begründetem Endometriose-Verdacht oder mit ungeklärter Sterilität wurde eine Bauchspiegelung (Laparoskopie) in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Bei Vorhandensein von peritonealen endometriotischen Läsionen wurden diese laparoskopisch entnommen. Es wurde keine Klassifikation der endometriotischen Läsionen vorgenommen. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter Kap. 2.1.1 beschrieben. Die Paraffinschnitte der in dieser Arbeit immunhistochemisch untersuchten Endometrioseherde mit korrespondierenden Endometrien derselben Patientin stammten aus der Abteilung für Pathologie (Leitung: Prof. Schmid) des Universitätsklinikums Essen.

2.2 Untersuchungen im Nacktmausmodell

2.2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche Nacktmäuse (Han: NMRI nu/nu) aus der Zucht des zentralen Tierlaboratoriums der Universitätsklinik Essen (Leitung: Prof. Dr. Militzer) verwendet. Bei Versuchsbeginn hatten die Nacktmäuse ein Alter von mind. 5 Wochen. Die Nacktmäuse wurden in einer keimfreien Umgebung unter kontrollierten Umweltbedingungen und regulierten Tag-/Nachtzyklen (je 12 h) gehalten. Futter, Einstreu und alle in den Raum gebrachten und verwendeten Geräte wurden autoklaviert. Die Tierversuche wurden mit behördlicher Erlaubnis durchgeführt (TSG-Nr. G 636/01 und G 792/04).

2.2.2 Ovariectomie und Hormonsubstitution

Für die beidseitige Ovariectomie wurden die Nacktmäuse mit einer intraperitonealen Injektion einer Mischung aus Rhompun (Bayer, Leverkusen) und Ketanest (Essex Pharma, München) nach Dosierungsangaben der Hersteller betäubt, durch zwei dorsale Schnitte die Ovarien entnommen, und die Tiere anschließend für mind. 14 Tage unbehandelt belassen. E₂ und P wurden in Benzylbenzoat gelöst und mit Erdnussöl verdünnt. Jeder Maus wurden täglich ab dem Tag der Operation über den gesamten Versuchszeitraum 0,05 µg E₂ und 30 µg P in 100 µl Erdnussöl s.c. mit einer Kanüle (23G x 1“ 0,6 mm x 25 mm, Becton Dickinson, Fraga, Spanien) appliziert. Zur Untersuchung der Wirkung von E₂ und P im Überschuss wurde zyklischen Mäusen 1 µg E₂ bzw. 1 mg P täglich s.c. verabreicht.

2.2.3 Transplantation der endometrialen Fragmente und ektopen Läsionen

Das eutope Endometrium und die ektopen Läsionen wurden wie unter Punkt 2.1.1 beschrieben vorbereitet.

Die Mäuse wurden wie unter Kapitel 2.2.2 beschrieben betäubt und unter sterilen Bedingungen laparotomiert. Pro Maus wurden 3 bis 6 Fragmente in einer Schlinge aus Nahtmaterial (Vicryl, 6/0, Ethicon, Norderstedt) befestigt und an das Peritoneum der Bauchwand angenäht (Abb. 2.1). Es wurde darauf geachtet, keine unnötigen Reizungen und Verletzungen zu verursachen. Anschließend wurde zunächst die Bauchwand, dann die Haut mit Einzelknopfnähten (Vicryl, 5/0, Ethicon) verschlossen und die Wunde einer täglichen Kontrolle unterzogen.

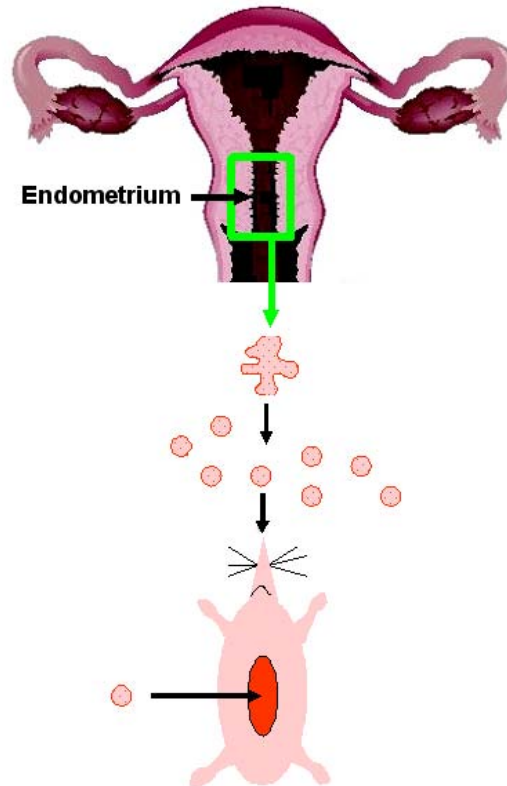


Abb. 2.1: Schematische Darstellung zur Transplantation von humanen endometrialen Fragmenten in die Peritonealhöhle der Nacktmäuse. Das Gewebe stammte aus Hysterektomien, Küretagen oder Laparoskopien und wurde in Fragmente von ca. 1 mm Kantenlänge zerkleinert. Jeweils 4-6 Fragmente wurden an die Bauchwand der Mäuse angenäht. Grafik erstellt in Anlehnung an: Schweppe (1989), übernommen von PD Dr. Ruth Grümmer. Die Abbildung des Uterus wurde folgender Internetseite entnommen: http://assets.families.com/Encyclopedias/gem_02_img0262.jpg.

2.2.4 Substanzapplikation

Die Antiprogestine Onapriston (freundlicherweise bereitgestellt durch die Firma Schering, Berlin) und Mifepriston (Biomol GmbH, Hamburg), das synthetische Androgen Danazol (Sigma Aldrich, Taufkirchen), die Gestagene Dydrogesteron (Solvay Pharmaceuticals B.V., Niederlande), MPA (Sigma Aldrich, Taufkirchen) und Medrogeston (Solvay Pharmaceuticals B.V., Niederlande) sowie der Aromatasehemmer Finrozol (Hormos Medical Corporation, Turku, Finnland) (Tab. 2.1) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in Benzylbenzoat gelöst und den Mäusen über einem Zeitraum von 5 Tagen s.c. in einem Volumen von 100 μ l

Benzylbenzoat:Rhizinus Öl (1:3) appliziert. Das Lösen und Verabreichen des GnRH-Antagonisten Cetrorelixacetat (Zentaris GmbH, Frankfurt) erfolgte in 5% D-Mannitol (Solvay Pharmaceuticals Forschungslabor, Hannover).

Tabelle 2.1: Übersicht über die Konzentrationen der eingesetzten Substanzen, die Anzahl der Gewebe verschiedener Patientinnen und die Anzahl der jeweils transplantierten Nacktmäuse

Substanz	Konzentration (µg/d)	Anzahl Patientinnen	Anzahl Mäuse
synthetisches Androgen			
Danazol	500	4	11
Danazol	2500	4	8
Gestagene			
Dydrogesteron	10	4	11
Dydrogesteron	50	4	9
MPA	50	5	12
Medrogeston	50	4	8
Antiprogestine			
Onapriston	100	2	5
Mifepriston	100	8	18
GnRH-Antagonist			
Cetrorelixacetat	1	4	9
Cetrorelixacetat	10	4	8
Aromatasehemmer			
Finrozol	50	5	12
Testsubstanzen (17βHSD-1 Inhibitoren)			
B10719933	50	6	14
B10715942	50	6	14
B10720840	50	4	9
B10720440	50	2	5

Als unbekannte Testsubstanzen wurden B10719933, B10715942, B10720840 und B10720440 (alle Solvay Pharmaceuticals Forschungslabor, Hannover) verabreicht. Diese Testsubstanzen wurden ebenfalls in Benzylbenzoat gelöst und jeweils 50 µg/d und über einem Zeitraum von 5 Tagen s.c. in einem Volumen von 100 µl Benzylbenzoat:Rhizinus Öl (1:3) appliziert. Da sich die

Substanz B10720840 nicht löste, wurde sie als Suspension verabreicht. Die Kontrolltiere bekamen jeweils nur das Lösungsmittel injiziert. Die Anzahl der Endometriumgewebe verschiedener Patientinnen, die Anzahl der jeweils transplantierten Nacktmäuse sowie die applizierten Substanzkonzentrationen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

2.2.5 Entnahme der transplantierten endometrialen Fragmente

Nach Beendigung der Versuche wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation getötet. Den Tieren wurde die Bauchhöhle durch einen Bauchschnitt eröffnet und die endometrialen Fragmente anhand der Fixierungsnähte lokalisiert. Die makroskopisch sichtbaren Fragmente wurden unter dem Binokular aus dem murinen Gewebe herauspräpariert und zwei Läsionen zur Isolierung von RNA sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Für immunhistochemische Untersuchungen wurde je ein Fragmente in 10% Formalin fixiert, nach einer Fixierungszeit von 24 h (4°C) mit Hilfe eines Einbettautomaten (Shandon, Frankfurt) zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Herstellung der Paraffinblöckchen erfolgte in einem „Histocentre“ (Shandon, Frankfurt). Von den Paraffinblöckchen wurden dann mit einem Mikrotom (Jung AG, Nussloch) 7 µm dicke Schnitte abgenommen und diese für morphologische Untersuchungen mit Hämatoxylin und Eosin (Noci et al. 1995) angefärbt.

2.2.6 Bestimmung von Organgewichten und Serumhormonwerten der Nacktmäuse

Das Körpergewicht der Versuchstiere sowie die Nassgewichte von Uteri, Ovarien und Nebennieren wurden bestimmt. Die Angaben der Organgewichte erfolgten als prozentualer Anteil des Körpergewichtes. Zur Bestimmung der Serumhormonwerte wurde nach der Tötung der Mäuse Blut mit einer Kanüle (27G x 3/4“ 0,4 mm x 19 mm, Becton Dickinson, Fraga, Spanien) aus dem Herz bzw. aus dem offenen Bauchraum entnommen, 2mal für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der E₂- und P-Werte im Serum der Nacktmäuse wurde im Routinelabor der gynäkologischen Abteilung des Universitätsklinikums Essen (Prof. Kimmig) mit Hilfe von ELISA (Lumineszenztest) mit dem

Analysegerät „Vitros® ECI Immunodiagnostik System“ (Ortho-Clinical-Diagnostics, Kompanie von Johnson & Johnson, Rochester, USA) und dem „Ortho-Clinical-Diagnostic Assay“ (Ortho-Clinical-Diagnostics, Kompanie von Johnson & Johnson, Rochester, USA) für E₂ und P nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.7 Bestimmung des Zyklusstadiums der Nacktmäuse

Das Zyklusstadium der Mäuse wurde durch Vaginalabstrich bestimmt. Hierzu wurde ein dünner Glasstab in die Vagina der Tiere eingeführt und leicht gedreht. Die auf dem Stab befindlichen Zellen wurden in einem Tropfen NaCl (0,9%) auf einem Objektträger abgestreift und mit einem Deckglas bedeckt. Die Auswertung erfolgte mit einem Zeiss Axiophot. Wenn überwiegend kernhaltige und wenig keratinisierte Epithelzellen in dem Ausstrich zu sehen waren, handelte es sich um einen Proöstrus, bei überwiegend keratinisierte Epithelzellen (Schollen) um einen Östrus, bei einem Gemisch aus wenig keratinisierten Zellen und Leukozyten um einen Metöstrus und bei Auftreten von hauptsächlich Leukozyten um einen Diöstrus (Lamb et al. 1978).

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Isolierung

Aus endometriotischen Läsionen sowie endometrialen Fragmenten, die in die Nacktmaus transplantiert wurden, dem nicht-transplantierten Kontrollgewebe und den endometrialen Zelllinien wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) isoliert. Die Gewebe wurden in 1 ml RLT-Lysepuffer mit Hilfe eines Homogenisators (Kinematica) bei einer Geschwindigkeit von 19.000 rpm homogenisiert. Zur feineren Lyse wurden die Homogenate anschließend mehrfach durch eine Kanüle (20G x 1 ½“ 0,9 mm x 40 mm, Becton Dickinson, Fraga, Spanien) aufgezogen. Zur Isolation von RNA aus Zellen wurden die Zellen einer 6-well Zellkulturplatte (Falcon, Heidelberg) in 1 ml RLT Puffer aufgenommen und mehrfach durch eine

Kanüle aufgezogen. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Gesamt-RNA wurde 2mal in 30 µl RNase freiem Wasser (Qiagen) eluiert.

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Bestimmung der Konzentration von RNA wurde in Quarzküvetten mit Hilfe des RNA/DNA Calculator Gene Quant II (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt.

2.3.2 DNase-Verdau

DNase I ist ein Enzym, das in der Lage ist, einzel- und doppelsträngige DNA abzubauen, ohne die während der Reaktion vorhandene RNA zu schädigen. Zur Beseitigung von möglichen DNA-Kontaminationen in der isolierten Gesamt-RNA wurde daher vor Durchführung der Reversen Transkriptions- (RT-) Reaktion ein DNase-Verdau durchgeführt. Nach dem Protokoll von Invitrogen wurden 2 µg Gesamt-RNA in 1x DNase I-Puffer mit 2 U DNase I (Invitrogen, Karlsruhe) mit sterilem DEPC-Wasser auf ein Volumen von 16 µl aufgefüllt und für 15 min bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden anschließend 2 µl EDTA (25 mM) zugesetzt und die Probe für 10 min bei 60°C erhitzt.

Nach der Isolierung von Gesamt-RNA aus endometriotischen Läsionen oder endometrialen Fragmenten, die in die Nacktmaus transplantiert worden waren, war es teilweise wegen der geringen Ausbeute nicht möglich, die Konzentration der Gesamt-RNA zu bestimmen. In diesen Fällen wurde die gesamte isolierte RNA in der SpeedVac (Savant, Holbrook, USA) eingedampft und komplett für den DNase-Verdau und die anschließende reverse Transkription eingesetzt.

2.3.3 Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription (RT) wird aus RNA cDNA synthetisiert, die anschließend als Template für PCR-Reaktionen dienen soll. Die 2 µg mit DNase I verdaute Gesamt-RNA wurde zur Auflösung von Sekundärstrukturen zunächst in einem Thermocycler für 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe des RT-Ansatzes erfolgte

bei 37°C im Thermocycler innerhalb einer Stunde die Synthese des komplementären DNA-Stranges durch das Enzym „Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase“ (M-MLV RT; Invitrogen, Karlsruhe). Als Oligonukleotid wurde Oligo-dT₁₆-Oligonukleotid (MWG, Ebersberg) verwendet. Zur Inaktivierung des Enzyms und zur Denaturierung des RNA/DNA-Doppelstranges wurde der RT-Ansatz anschließend für 5 min bei 90°C erhitzt. Die erhaltene cDNA konnte dann sofort für die PCR-Experimente eingesetzt werden.

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Semiquantitative RT-PCR (RT-PCR)

Zum Nachweis der Transkripte und zur relativen Quantifizierung der Expression unterschiedlicher Gene wurde eine RT-PCR in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Vier Mikroliter des RT-Ansatzes (s. Kap. 2.3.3) wurden mit humanen genspezifischen Oligonukleotiden (Sequenzen s. Tab. 2.2) für die PCR eingesetzt. Durch Vergleich der Oligonukleotidsequenzen mit Hilfe des Sequenzvergleichsprogramms BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) in der EMBL (European Molecular Biology Laboratory)-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) wurden zuvor mögliche Kreuzreaktivitäten der Oligonukleotide mit murinen Sequenzen ausgeschlossen. Von den Oligonukleotiden zur Amplifizierung von β -Aktin wurden 2, für ER α und STS jeweils 25 und von den restlichen Oligonukleotiden 50 pmol pro PCR-Ansatz eingesetzt. Das gewünschte Zielgen und das konstitutiv exprimierte β -Aktin Gen wurden außer bei Aromatase und Cx26 in dem gleichen Reaktionsansatz amplifiziert, die weiteren Oligonukleotide sind der Tabelle 2.2 zu entnehmen. Für jedes zielgenspezifische Oligonukleotidpaar wurde die optimale Annealing-Temperatur bestimmt (Tab. 2.2). Als Positivkontrolle wurde bei jedem PCR-Lauf humanes Ovargewebe mit amplifiziert. Die initiale Denaturierung in Schritt 1 des PCR-Programmes erfolgte für 10 min bei 94°C. In Schritt 2 wurde die Denaturierung der DNA für 1 min bei 94°C, das Annealing für 45 s bei der für die Oligonukleotide spezifischen Temperatur (Tab. 2.2) und die Elongation für 90 s bei 72°C durchgeführt. Der Schritt 2 wurde zur Amplifikation von ER α

32, für die restlichen Gene 36mal wiederholt. Die finale Elongation für 10 min fand bei 72°C statt.

Nach der Amplifikation wurden die Transkripte mit 1/10 Volumen 5x DNA-Probenpuffer versetzt (s. Kap. 2.6), mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und mit Ethidiumbromid in 2%igen Gelen sichtbar gemacht. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer (s. Kap. 2.6). Die aufgetrennte DNA wurde unter dem UV-Licht am Geldokumentationsgerät (Gel Imager, Intas, Göttingen) analysiert. Die Bestimmung der Bandenstärke nach Abzug des Hintergrundes erfolgte densitometrisch mit Hilfe des Programms Gelscan Professional V4.0. bzw. mit dem Programm Scion Image für Windows (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA). Zur Verifizierung von PCR-Produkten und zur Herstellung von Standardreihen für die Real-Time PCR wurden sichtbare DNA-Banden aus dem Agarosegel mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten. Mittels des MiniElute Gel Extraction Kits (Qiagen) wurde die DNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA-Konzentration wurde UV-spektrophotometrisch bestimmt.

Um die relative Expression zu ermitteln, wurde der Expressionslevel des Zielgens auf die Expression von β -Aktin bezogen. Zur Ermittlung der x-fachen Expression eines Gens wurde die relative Expression im humanem Endometrium kultiviert in den mit Lösungsmittel behandelten Mäusen gleich 1 gesetzt und der relative Expressionslevel des Zielgens gegen diesen Wert abgeglichen und so normalisiert.

Tabelle 2.2: Charakteristika der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Strang	Accession	Sequenz 5'→3'	AT	IS	Amplikon
Oligonukleotide für die RT-PCR						
β-Aktin-F	sense	NM_001101	ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG TAC G			697
β-Aktin-R	antisense		CTG ATC CAC ATC TGC TGG AAG GTG G			
17βHSD-1-F ¹	sense	NM_000413.1	AGG CTT ATG CGA GAG TCT GG	58	x	348
17βHSD-1-R ¹	antisense		ATG GCG GTG ACG TAG TTG GA			
17βHSD-2-F ¹	sense	NM_002153.1	GGT GTC ATG CTT CCT CAT GT	58		417
17βHSD-2-R ¹	antisense		CTT TGT GAC CTC CAC AGT TC			
STS-F	sense	NM_000351.3	CCT TTT CTT GGG CTT CCT TC	50		402
STS-R	antisense		CCA TTA CTT CCG CCA TGA AT			
Aromatase-F ²	sense	X13589.1	TAC TAC AAC CGG GTA TAT GG	50	x	376
Aromatase-R ²	antisense		TGT TAG AGG TGT CCA GCA TG			
Aromatase-F ³	sense	X13589.1	TGG CTA CCC AGT GAA AAA GG	54	x	651
Aromatase-R ³	antisense		TCA AAG CAC ATT TGG TGG AA			
ERα-F	sense	NM_000125.2	AGT GTA CAC ATT TCT GTC CAG CA	59	x	227
ERα-R ⁴	antisense		ACG TTC TTG CAC TTC ATG CTG TA			
PR (A+B)-F	sense	NM_000926.2	GGT CTA CCC GCC CTA TCT CA	50	x	396
PR (A+B)-R	antisense		GGC TTG GCT TTC ATT TGG AA			
Oligonukleotide für die Real-Time PCR						
β-Aktin_F	sense	NM_001101	ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAA A		x	213
β-Aktin_R	antisense		TAC GGC CAG AGG CGT ACA GGG ATA G			
17βHSD-1-F	sense	NM_000413.1	ATG GCG GTG ACG TAG TTG GA	60	x	176
17βHSD-1-RT-R	antisense		CAC AGC AAG CAA GTC TTT CG			
17βHSD-2-F	sense	NM_002153.1	GGT GTC ATG CTT CCT CAT GT	60	x	157
17βHSD-2-RT-R	antisense		TCA AAA CTC CGG CAA ATA CC			
STS-F	sense	NM_000351.3	CCT TTT CTT GGG CTT CCT TC	60		142
STS-RT-R	antisense		TGT TCC GCT GTA TGA ACT GG			
Aromatase-F ³	sense	X13589.1	TGG CTA CCC AGT GAA AAA GG	60		181
Aro-RT-R	antisense		CCA TGG CGA TGT ACT TTC CT			
ERα-RT-F	sense	NM_000125.2	GTG CCT GGC TAG AGA TCC TG	60	x	130
ERα-RT-R	antisense		GAT CTC CAC CAT GCC CTC TA			
PR (A+B)-F	sense	NM_000926.2	AGC CCA CAA TAC AGC TTC GAG	60	x	171
PR (A+B)-RT2-R	antisense		CGA TGC AGT CAT TTC TTC CA			
Cyr61-up2	sense	NM_001554.3	GTG ACG AGG ATA GTA TCA AGG ACC	60	x	197
Cyr61-dw2	antisense		ATT TCT GGC CTT GTA AAG GGT TG			
Cx26-RT2-F	sense	NM_004004.3	TCG CAT TAT GAT CCT CGT TGT G	60		117
Cx26-RT2-R	antisense		GGG GAA GTA GTG ATC GTA GCA C			
Cx43-F	sense	NM_000165.2	GCG TGA GGA AAG TAC CAA AC	60		218
Cx43-R	antisense		CCA GCA GTT GAG TAG GCT TG			

*: Intronüberspannend

¹: Zeitoun et al. (1998)²: Utsunomiya et al. (2001)³: Dheenadayalu et al. (2002)⁴: Mesiano et al. (2002)

Accession: NCBI-Datenbankeintrag

IS: Intron-überspannende Oligonukleotide sind durch (x) gekennzeichnet

AT: verwendete Annealing-Temperatur (°C) bei der PCR

Amplikon: Größe des PCR-Produktes in bp

Real-Time PCR

Für die quantitative Real-Time PCR wurde der qPCR MasterMix für SYBR Green I (Eurogentec, Seraing, Belgien) in einem Volumen von 25 µl nach Angaben des Herstellers verwendet. In der Reaktion wurden 2 µl des RT-Ansatzes mit 5 pmol genspezifischen Oligonukleotiden (Sequenzen s. Tab. 2.2) eingesetzt. Eventuelle Kreuzreaktionen der Oligonukleotide mit murinen Sequenzen wurden zuvor ausgeschlossen (s. Kap. 2.3.4). Das Zielgen und β -Aktin wurden in getrennten Reaktionsansätzen amplifiziert. Im ersten Schritt des PCR-Programmes wurden die Proben für 2 min bei 50°C erhitzt. Im zweiten Schritt erfolgte die Aktivierung der Taq-Polymerase für 10 min bei 95°C. Der dritte Schritt bestehend aus einer Erhitzung für 15 s bei 95°C und einer anschließenden Inkubation für 1 min bei 60°C wurde 40mal wiederholt. Die Spezifität der Amplifikation wurde durch eine anschließende Schmelzanalyse der PCR Produkte überprüft. Zur Ermittlung der Schmelzkurve wurden die Proben nach dem letzten PCR-Zyklus in 0,1°C-Schritten von 60°C bis 90°C erhitzt und dabei gleichzeitig die Fluoreszenzintensität gemessen. Die erste Ableitung der Fluoreszenzintensität ergibt die Schmelzkurve, in der das spezifische Produkt als einheitlicher Peak erscheinen sollte. Zur zusätzlichen Überprüfung der Spezifität der Amplifikation erfolgte eine Auftrennung der Proben in einem Agarosegel (2%) (s. Kap. 2.3.4) (Abb. 2.2).

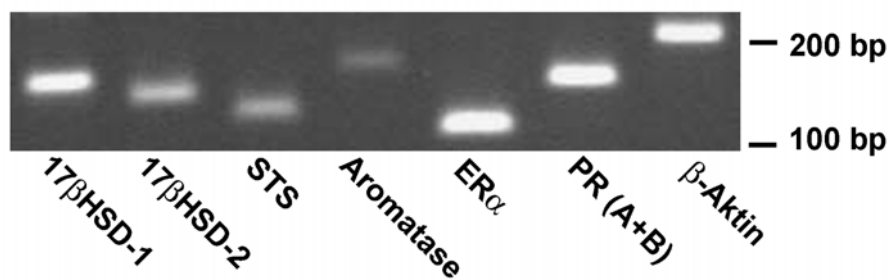


Abb. 2.2: Auftrennung der Amplifikationsprodukte im Agarosegel nach Real-Time PCR. Es konnte gezeigt werden, dass keine unspezifischen Amplifikationen stattgefunden haben.

Der Farbstoff SYBR Green wird durch Einlagerung in die Doppelstränge der DNA zur verstärkten Fluoreszenz befähigt. Während des PCR-Laufes akkumuliert das PCR-Produkt und

die Menge des gebundenen SYBR Green nimmt mit der Menge des PCR-Produktes zu. Diese Zunahme der Fluoreszenzintensität wird in jedem Zyklus gemessen.

Nach erfolgter PCR wurde manuell der Threshold-Cycle (C_T -Wert), d.h. der PCR-Zyklus, bei dem sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt, definiert und die korrespondierende Zykluszahl jeder Probe bestimmt. Um aus den während des PCR-Laufes ermittelten C_T -Werten die cDNA-Konzentrationen in den Proben ermitteln zu können, wurde für jedes Gen eine Standardreihe verwendet. Für diese Standardreihe wurde 1 μ l sequenzspezifische cDNA in definierten Konzentrationen von 10 pg/ μ l bis 0,01 fg/ μ l für die PCR eingesetzt. Für jede Probe wurden die Reaktionen 3mal durchgeführt. Mithilfe der C_T -Werte der Standard cDNA konnte so die Konzentration der amplifizierten cDNA jeder Probe zugeordnet werden. Aufgrund der unterschiedlichen RNA-Qualität in den Gewebeproben wurde die Expression eines jeden Gens (Mittelwert der Konzentrationen aus 3 PCR-Reaktionen) in Relation zur mittleren Konzentration der β -Aktin cDNA gesetzt. Diese Normierung erlaubte eine Minimierung der während der RNA-Extraktion und Reversen Transkription entstandenen Variationen. Die PCR-Läufe wurden mit dem GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in einer 96er well-Platte (96-well optical reaction plate, Applied Biosystems) mit optischen Deckeln (MicroAmp optical caps, Applied Biosystems) durchgeführt.

Zur Untersuchung der Expression in humanem Gewebe kultiviert in Nacktmäusen mit und ohne Substanzbehandlung wurde die Expression im Vehikeltier gleich 1 gesetzt und die Expression im mit Substanz behandelten Tier entsprechend bestimmt.

2.4 Immunhistochemische Untersuchungen

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an Paraffinschnitten durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte 2mal für 5 min in Histoclear entparaffiniert. Zur Entwässerung wurden sie anschließend kurz in Isopropanol, für 6 min in 96% Ethanol und für 3 min in 70% Ethanol inkubiert. Nach dem Waschen der Schnitte in Aqua dest. und PBS erfolgte ein 2maliges Behandeln für 5 min in einer Mikrowelle bei 250 Watt in 0,01 M Citrat Puffer pH 6.

Zwischen der Mikrowellen-Behandlung wurden die Schnitte für 5 min in der Pufferlösung belassen. Nach Abkühlen bei RT (15 min) wurden die Schnitte in Aqua dest. und anschließend für 5 min in PBS gewaschen. Um eine endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren, wurden die Schnitte für 15 min bei RT in einer 1% Wasserstoffperoxidlösung in PBS inkubiert. Nach einem erneuten Waschen mit PBS (5 min) wurden 2mal für 5 min unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit PBS/BSA (0,5%) abgesättigt. Danach wurde jeder Schnitt mit einem Pap-Pen (Dako, Hamburg) eingekreist und die im Weiteren verwendeten Lösungen in einem Volumen von 100 µl direkt auf die Schnitte geträufelt. Unspezifischen Reaktionen des Sekundärantikörpers wurde durch eine 20minütige Inkubation der Schnitte bei 37°C in 2% Pferde- bzw. Ziegen serum (Vectastain, Peterborough, UK) in PBS vorgebeugt und die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit dem in PBS verdünnten Primärantikörper inkubiert. Als Primärantikörper wurden verwendet:

- monoklonaler mouse-anti-human Cytochrome P450 Aromatase (Serotec, Düsseldorf) 1:50
- polyklonaler rabbit-anti-human 17βHSD-1 (Pineda-Antikörperservice, Berlin) 1:500
- monoklonaler mouse-anti human Ki67 (Mib-1) (Dako, Hamburg) 1:10

Nach zwei weiteren Waschschritten für jeweils 5 min in PBS/BSA (0,5%) erfolgte die Inkubation mit einem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (1:200 in PBS; Vectastain, Peterborough, UK) für eine Stunde bei RT, ebenfalls in einer feuchten Kammer. Nach 2 Waschschritten für 5 min in PBS/BSA (0,5%) wurden die Schnitte unter Verwendung eines Detektionssystems (StreptABComplex/HRP, Dako, Hamburg) für 40 min mit einem Strept. A/B-Komplex (Vectastain, Peterborough, UK) und für 5 min mit dem chromogenen Substrat für die Peroxidase (DAB) inkubiert. Die Farbreaktion wurde unter dem Mikroskop beobachtet und die Reaktion in PBS abgestoppt. Nach Waschen der Schnitte unter fließendem Wasser (10 min) wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Histomount eingedeckt. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axiophot. Als Positivkontrolle für 17βHSD-1 und Aromatase diente reife

humane Plazenta, als Negativkontrollen Schnitte, die mit PBS ohne Primärantikörper inkubiert wurden.

In Kooperation mit dem Solvay Pharmaceuticals Forschungslabor, Hannover, wurden dort zusätzliche immunhistochemische Untersuchungen zur Detektion von 17 β HSD-1 durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte 2mal für 30 min in Roticlear (Roth, Karlsruhe) entparaffiniert und 3mal für 5 min in absolutem Ethanol inkubiert. Nach dem Rehydrieren wurden sie für 35 min in einem Dampfgerar bei einer Temperatur von 90°C in 10x Target Retrieval Solution (Dako, Hamburg) erhitzt, anschließend für 10 min bei RT abgekühlt und für 5 min in Aqua dest. gewaschen. Die Durchführung der Immunreaktionen erfolgte mit dem DAKO EnVision System + HRP, anti-rabbit, DAB+ (Dako, Hamburg) nach Angaben des Herstellers. Zwischen den einzelnen Anwendungsschritten wurden die Schnitte für 5 min in PBS +0,05% Tween 20 gespült. Der Primärantikörper wurde 1:1000 in PBS + 3% BSA verdünnt und für 45 min auf den Schnitten inkubiert. Die Schnitte wurden in Aquatex (Merck, Karlsruhe) eingedeckt.

Die immunhistochemischen Inkubationen zur Untersuchung der Proliferation von humanem Endometrium erfolgten durch Färbung mit dem oben aufgeführten Proliferationsmarker Ki67. Die Antikörperinkubationen sowie die Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin erfolgte im histologischen Labor des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Essen (Leitung: Prof. Dr. Schmid).

2.5 Statistische Auswertung

Die Signifikanz ($p \leq 0,05$) der mit Hilfe der semiquantitativen RT- bzw. quantitativen Real-Time PCR ermittelten Expressionsunterschiede wurde mit dem gepaarten und ungepaarten (Studentischen) T-Test berechnet und mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2000 ermittelt. Bei einer Fallzahl von 2 wurde der Mittelwert gebildet und keine statistische Auswertung durchgeführt.

2.6 Verwendete Lösungen

Citrat Puffer: Lösung A: 0,1 M Zitronensäure in 1 l Aqua dest. Lösung B: 0,1 M Natriumcitrat in 1 l Aqua dest., 9 ml Lösung A und 41 ml Lösung B zu 450 ml Aqua dest.

DNA-Probenpuffer: 25 mM Tris/HCl (pH 7,0), 150 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 25% Glycerin

Ethidiumbromidlösung: 10 mg/ml in Aqua dest.

Moscona-Lösung: 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0,2 mM KH₂PO₄, 0,4 mM NaH₂PO₄·xH₂O, 9 mM D-Glucose Monohydrat

Nährmedium: 500 ml Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium, 500 ml Ham's F12, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

PCR Ansatz: 4 µl RT-Ansatz, 1x PCR-Puffer, 10 mM dNTP-Mix, je x pmol antisense/sense genspezifisches Oligonukleotid, je x pmol antisense/sense β-Aktin Oligonukleotid, 2,5 U Biotherm DNA-Polymerase (Genecraft, Lüdinghausen) ad 50 µl Aqua dest.

Real-Time PCR Ansatz: 1 bzw. 2 µl RT-Ansatz, 12,5 µl Mastermix (Eurogentec), 0,75 µl Sybr Green (Eurogentec), 5 pmol Oligonukleotid ad 25 µl Aqua dest.

RT-Ansatz: 2 µg RNA, 1x First-Strand Buffer (5x) (Invitrogen, Karlsruhe), 10 mM dNTP-Mix (Genecraft, Lüdinghausen), 0,5 µg Oligo dT₁₆ (MWG, Ebersberg), 0,1 M DTT (Invitrogen), 200 U M-MLV RT (Invitrogen) ad 50 µl DEPC Wasser

TBE-Puffer (10x): 890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA

Zellkulturmedium: DMEM (ohne Phenolrot), 10% FCS (Aktivkohle behandelt), 1% Antibiotika: Pen/Strep, 0,1% Natriumpyruvat

2.7 Feinchemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem höchsten käuflichen Reinheitsgrad.

Neben den gebräuchlichen Laborchemikalien wurden verwendet:

Agarose	PeqLab (Erlangen)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Bromphenolblau	Sigma (Taufkirchen)
β -Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
DAB Liquid Substrat-Chromogen-System	DAKO (Hamburg)
DMEM	Gibco BRL (Karlsruhe)
100 bp DNA Leiter	Genecraft (Lüdinghausen)
1Kb DNA-Leiter	Genecraft (Lüdinghausen)
DNase I	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTP-Mix	Genecraft (Lüdinghausen)
DTT	Invitrogen (Karlsruhe)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Erdnussöl	Henry Lamotte GmbH (Bremen)
17 β -Estradiol	Sigma (Taufkirchen)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Formaldehyd (37%)	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Sigma (Taufkirchen)
Ham's F-12	Biochrom KG (Berlin)
Histomount (Xylolersatz-Eindeckmedium)	Shandon (Frankfurt)
Hämatoxylin	Shandon (Frankfurt)
IPTG	Sigma (Taufkirchen)
isotone NaCl-Lösung (0,9%)	Braun (Melsungen)
2-Methyl-2-Butanol (t-Amylalkohol)	Sigma (Taufkirchen)
Lysozym	Sigma (Taufkirchen)
M-MLV Reverse Transcriptase + Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Nahtmaterial	Ethicon (Norderstedt)
Natriumcitrat	Merck (Darmstadt)

Oligo(dT) ₁₆	MWG (Ebersberg)
PBS Dulbecco	Seromed (Berlin)
Penicillin	Boehringer (Mannheim)
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung	Gibco BRL (Karlsruhe)
Progesteron	Sigma (Taufkirchen)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma (Taufkirchen)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Streptomycin	Boehringer (Mannheim)
Suprapur Wasserstoffperoxid (30%)	Merck (Darmstadt)
2,2,2- Tribromethanol	Aldrich (Taufkirchen)
Taq Polymerase + Puffer	Genecraft (Lüdinghausen)
Trypsin/EDTA	Gibco BRL (Karlsruhe)
X-Gal	Hybaid-AGS (Heidelberg)
Citronensäure	Merck (Darmstadt)

2.8 Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
17βHSD	17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase
β-ME	β-Mercaptoethanol
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
BSA	Rinder- („bovine“-) Serumalbumin
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre („complementary“) DNA
CT	„Threshold-Cycle“
Cyr61	„cysteine rich protein 61“
Cx	Connexin

d	Tag(e)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E ₂	17β-Östradiol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ER	Östrogenrezeptor(en)
EtOH	Ethanol
F/FOR	„forward“
GnRH/LHRH	„Gonadotropin Releasing Hormon“, Gonadoliberin bzw. „luteinising hormone releasing hormone“
GTE	Glucose-Tris-EDTA
h	Stunde
HES	“human endometrial surface”
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IVF	in vitro Fertilisation
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LH	Luteinisierendes Hormon, Lutropin
M	Molar, Mol/Liter
min	Minute
mind.	mindestens
mM	Millimolar
MPA	Medroxyprogesteron Acetat
mRNA	Boten- („messenger“-) RNA
n	Anzahl

NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
nd	nicht durchgeführt
OD	optische Dichte
OVX	ovarektomiert
P	Progesteron
Pat.	Patientin/-nen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PR	Progesteronrezeptor(en)
R/REV	„reverse“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCID	„severe combined immunodeficient“
s.c.	subkutan
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPRM	selektiver Progesteronrezeptor-Modulator
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Trypsin/EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	ultraviolett
ü.N.	über Nacht
w/v	Gewichtsprozent
x-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen an eutopen humanen Endometrien von Patientinnen mit und ohne Endometriose und an Endometrioseherden

Zunächst wurde die Expression auf Transkriptionsebene von Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzymen in eutopen Endometrien der Proliferations- und der Sekretionsphase untersucht. Hierzu wurden Endometrien von Patientinnen mit Endometriose denen von Patientinnen ohne Endometriose gegenübergestellt. Da in ektopen endometriotischen Läsionen eine starke Hochregulation der Aromatase Gen- und Proteinexpression im Vergleich zum eutopen Endometrium vorliegt (Huang et al. 2005), wurde zudem die Expression der Aromatase in Endometrioseherden mit der im korrespondierenden eutopen Endometrium verglichen.

3.1.1 Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in eutopen humanen Endometrien

Die Expression der Steroidhormonrezeptoren ER α und PR (A+B) wurde in eutopen Endometrien von Frauen mit und ohne Endometriose aus der Proliferationsphase im Vergleich zur Sekretionsphase mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht (Abb. 3.1). Für den ER α (Abb. 3.1 A, B) zeigte sich für beide Patientinnengruppen im Vergleich zur Sekretionsphase (Abb. 3.1 B) eine tendenziell stärkere aber nicht signifikant stärkere Expression in den Endometrien aus der Proliferationsphase (Abb. 3.1 A). Zudem zeigte sich für beide Zyklusphasen eine tendenziell erhöhte Transkription im Endometrium von Patientinnen mit Endometriose im Vergleich zu Patientinnen ohne Endometriose. Da sich die PR Isoformen A und B nur durch das Fehlen der ersten 164 Aminosäuren von PR B in PR A unterscheiden, ist es nicht möglich, spezifische Oligonukleotide für PR A zu entwickeln. Aus diesem Grund wurden PR A+B zusammen untersucht. Die mRNA Expression des PR (A+B) (Abb. 3.1 C, D) war in der Proliferationsphase (Abb. 3.1 C) signifikant erniedrigt in den Endometrien von Patientinnen mit Endometriose im

Vergleich zu der Expression in den Endometrien von Patientinnen ohne Endometriose. Wegen der geringen Probenzahl von Patientinnen mit Endometriose aus der Sekretionsphase (Abb. 3.1 D) konnte zur Expression der Steroidhormonrezeptoren in Endometrien aus dieser Zyklusphase keine statistischen Aussagen getroffen werden.

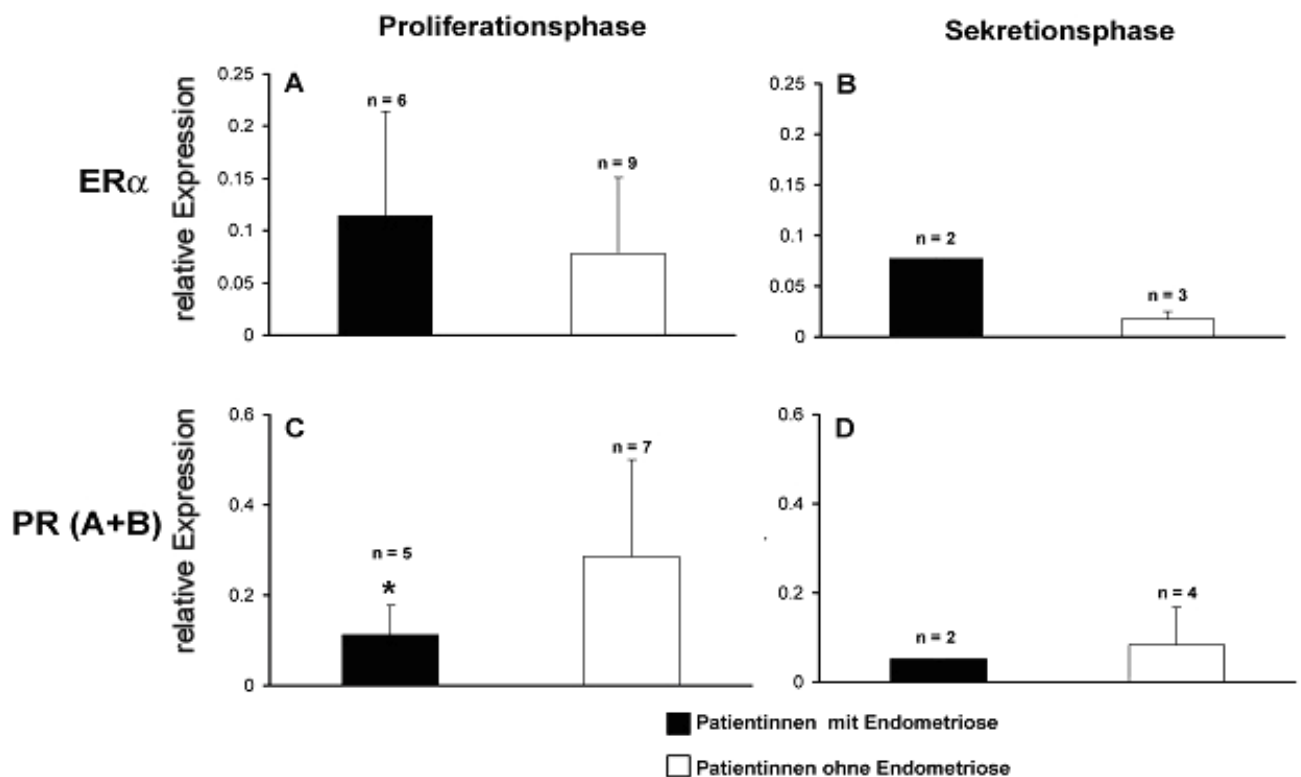


Abb. 3.1: Real-Time PCR Analyse von ER α und PR (A+B) in eutopen Endometrien der Proliferations- und Sekretionsphase von Patientinnen mit und ohne Endometriose.

* = $p \leq 0,05$

3.1.2 Expression von Steroid-konvertierenden Enzymen in eutopen humanen Endometrien

Transkription Steroid-konvertierender Enzyme

Auch die Expression der Östrogen-metabolisierenden Enzyme 17 β HSD-1, 17 β HSD-2, STS und Aromatase wurde sowohl in der Proliferations- als auch in der Sekretionsphase im Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose bestimmt (Abb. 3.2). Aufgrund der geringen Probenzahl von Patientinnen mit Endometriose aus der Sekretionsphase konnten zu dieser Zyklusphase keine statistischen Aussagen gezogen werden. Die eutopen Endometrien von Patientinnen mit Endometriose wiesen in der Proliferationsphase eine signifikant höhere Expression von 17 β HSD-1 auf als die von Patientinnen ohne Endometriose dieser Zyklusphase (Abb. 3.2 A), während sich in der Sekretionsphase kein Unterschied zwischen den beiden Patientinnengruppen zeigte (Abb. 3.2 B). Das Enzym 17 β HSD-2, das aus E₂ Östron synthetisiert, war in der Proliferationsphase bei beiden Patientinnen-Gruppen nur sehr schwach exprimiert (Abb. 3.2 C). In der Sekretionsphase (Abb. 3.2 D) stieg die Transkriptmenge bei beiden Patientinnengruppen stark an, wobei bei den Patientinnen mit Endometriose tendenziell mehr 17 β HSD-2 exprimiert wurde als bei den Patientinnen ohne Endometriose. Die Expression von STS war bei beiden Patientinnengruppen in beiden Zyklusphasen gleich (Abb. 3.2 E, F). Das Schlüsselenzym der Östrogen-Synthese, die Aromatase, wurde im Endometrium von Patientinnen mit und ohne Endometriose exprimiert (Abb. 3.2 G, H). In der Sekretionsphase (Abb. 3.2 H) zeigte sich bei beiden Patientinnengruppen eine stärkere mRNA-Expression als in der Proliferationsphase (Abb. 3.2 G), die zudem in der Sekretionsphase bei den Patientinnen ohne Endometriose im Vergleich zu Patientinnen mit Endometriose leicht erhöht war.

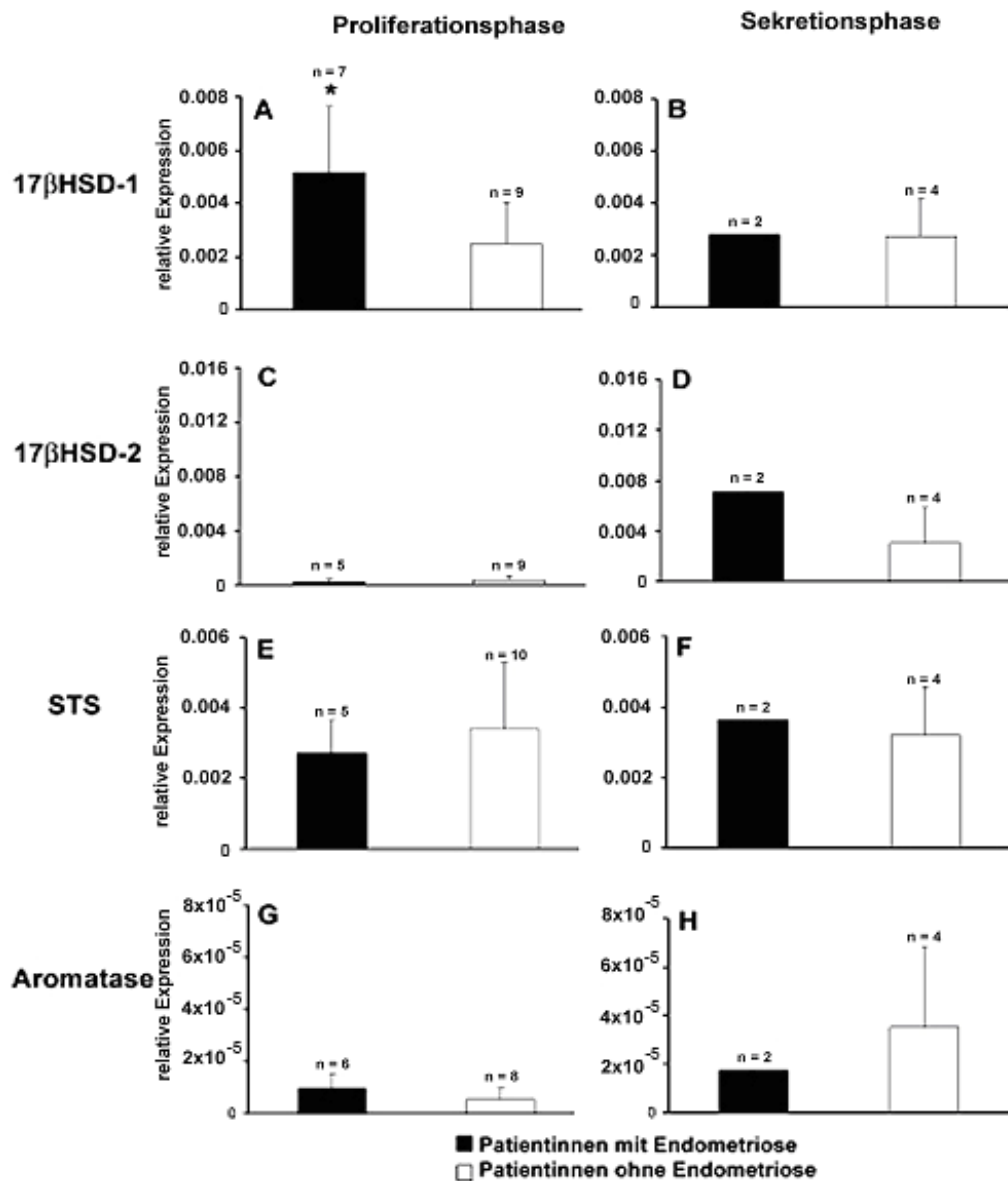


Abb. 3.2: Real-Time PCR Analyse von Steroid-konvertierenden Enzymen in eutopen Endometrien von Patientinnen mit und ohne Endometriose.

A-B) Expression von 17βHSD-1 mRNA in Endometrien der Proliferationsphase (A) und in der Sekretionsphase (B). * = $p \leq 0,05$

C-D) Expression der 17βHSD-2 Transkripte in der Proliferations- (C) und Sekretionsphase (D).

E-F) Expression der STS mRNA in Endometrien der Proliferations- (E) und Sekretionsphase (F).

G-H) Genexpression der Aromatase in der Proliferations- (G) und Sekretionsphase (H).

Aufgrund der geringen Probenzahl von Patientinnen mit Endometriose in der Sekretionsphase konnten zu dieser Zyklusphase keine statistischen Aussagen gezogen werden.

Da sich die Untersuchungen, ob Aromatase im eutopen Endometrium exprimiert wird oder nur in Patientinnen mit Endometriose, sehr stark widersprechen (Bulun et al. 1993; Kitawaki et al. 1997; Dheenadayalu et al. 2002; Wolfler et al. 2005), wurde zusätzlich eine qualitative Untersuchung der Aromatase-Transkription an Endometrien von 24 Patientinnen mit Endometriose und 25 Patientinnen ohne Endometriose mittels RT- und Real-Time PCR durchgeführt. Hierbei zeigten 95,83% der Patientinnen mit Endometriose und 80,00% der Patientinnen ohne Endometriose eine Aromatase-Expression im eutopen Endometrium (Abb. 3.3).

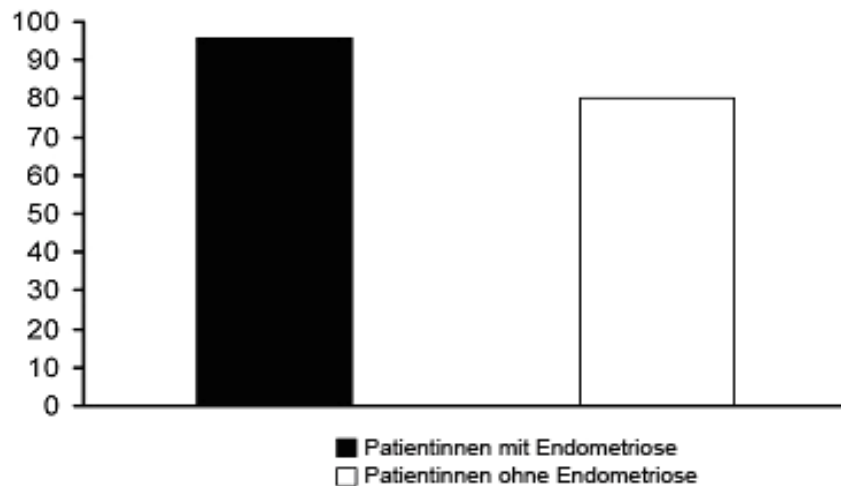


Abb. 3.3: Qualitativer Nachweis von Aromatase-Transkripten im eutopen Endometrium von Patientinnen mit und ohne Endometriose (RT-PCR und Real-Time PCR) aus der Proliferations- und Sekretionsphase.

Immunhistochemische Lokalisation von 17 β HSD-1 und Aromatase

Durch Immunhistochemie wurde untersucht, ob die Steroid-konvertierenden Enzyme in den humanen Fragmenten auch auf Proteinebene detektiert werden können. Da für 17 β HSD-2 und STS keine Antikörper erhältlich waren, konnten die Untersuchungen nur für die Expression der 17 β HSD-1 und Aromatase Proteine durchgeführt werden.

Generell ist die Immunreaktion der Aromatase relativ schwach, im Vergleich zeigte sich aber eine Reaktion gegen die Aromatase in den Drüsenepithelien der eutopen Endometrien von 5

Patientinnen. Die Expressionsstärke war von den Krankheitsbildern der Patientinnen abhängig. Eine nur sehr schwache Expression war bei Frauen mit Kinderwunsch ohne diagnostizierbare gynäkologische Erkrankung zu verzeichnen (Abb. 3.4 A). Eine stärkere Expression zeigte sich bei einer Patientin mit Uterus myomatosus (Abb. 3.4 B), wogegen die stärkste Expression bei einer Patientin mit Leiomyom (Abb. 3.4 C) auftrat. Inkubationen des 17 β HSD-1 Antikörpers an eutopen Endometrien aus der Proliferationsphase wiesen eine deutliche Färbung des luminalen Epithels sowie eine etwas schwächere Färbung des apikalen Drüsenepithels und der Stromazellen auf (Abb. 3.4 E, F). Als Positivkontrolle wurde für beide Proteine eine Immunhistochemie an Plazentagewebe durchgeführt, von dem bekannt ist, dass es 17 β HSD-1 (Fournet-Dulguerov et al. 1987; Peltoketo et al. 1999) sowie auch Aromatase (Li et al. 2005) im Synzytiotrophoblasten exprimiert (Abb. 3.4 D, G).

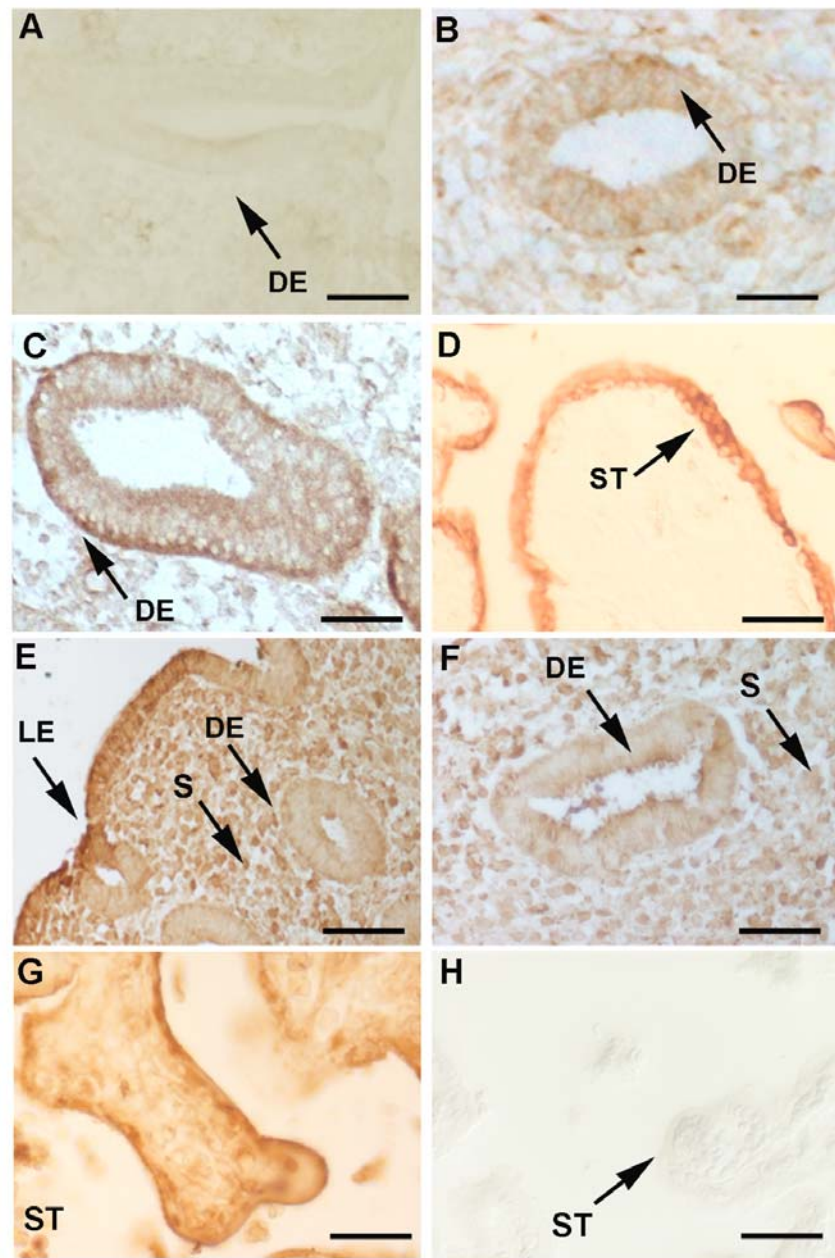


Abb. 3.4: Repräsentative immunhistochemische Lokalisation von Aromatase und 17 β HSD-1 in eutopen Endometrien und in reifer Plazenta.

A-D) Lokalisation der Aromatase im Endometrium ohne diagnostizierbare gynäkologische Erkrankung (A), im Endometrium einer Patientin mit Uterus myomatosus (B), einer Probe mit Leiomyom (C) sowie in Plazenta (D)

E-G) Lokalisation der 17 β HSD-1 im eutopen Endometrium (E, F) sowie in der Plazenta (G).

H) Negativkontrolle ohne 1. Antikörper

DE: Drüsenepithel, LE: Luminales Epithel, S: Stroma, ST: Synzytiotrophoblast

Balken: in A, E, F, H: 80 μ m, in B, C, D, G: 40 μ m

3.1.3 Immunhistochemische Lokalisation von Aromatase in ektopen endometriotischen Läsionen im Vergleich zum korrespondierenden eutopen Endometrium

Aus der Literatur ist bekannt, dass in ektopen endometriotischen Läsionen eine starke Hochregulation der Aromatase Gen- und Proteinexpression im Vergleich zum eutopen Endometrium vorliegt (Huang et al. 2005). Um dies zu verifizieren, wurde die Expression des Aromatase-Proteins in eutopen Endometrien und korrespondierenden peritonealen endometriotischen Läsionen derselben Patientin untersucht (Abb. 3.5).

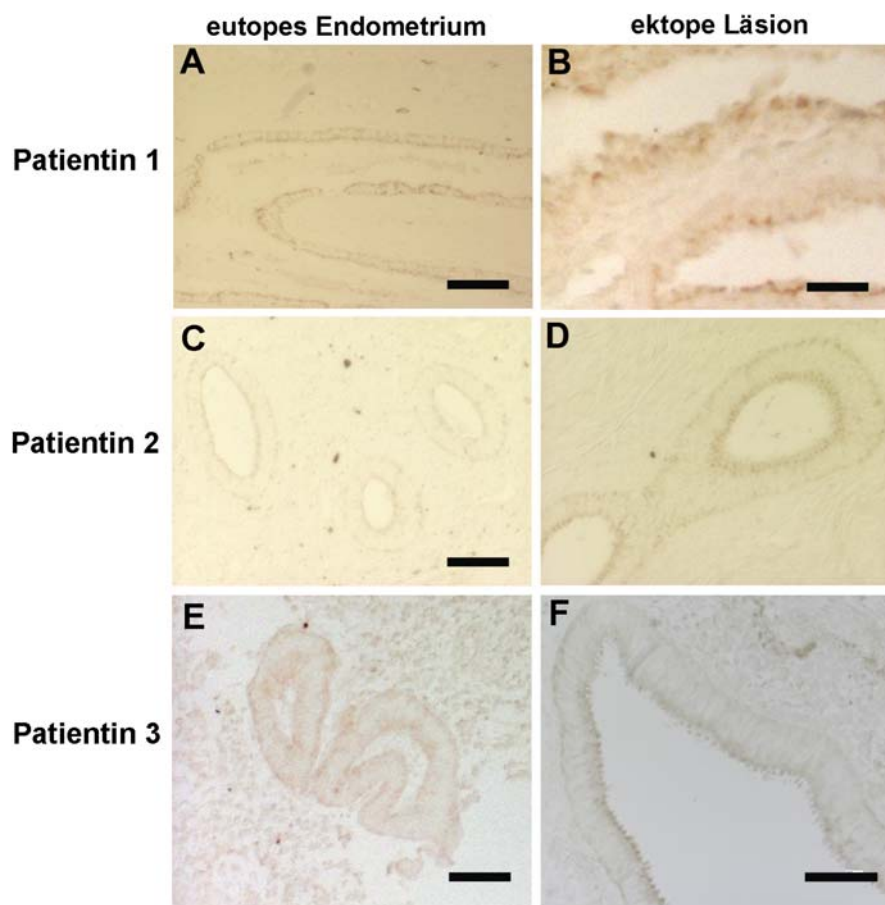


Abb. 3.5: Immunhistochemische Lokalisation von Aromatase in eutopen Endometrien von Endometriose-Patientinnen und korrespondierenden peritonealen endometriotischen Läsionen. Im eutopen Endometrium (A, C, E) war das Protein schwach nachweisbar, während die Färbung in den Drüsenepithelien der endometriotischen Läsionen (B, D, F) stärker hervortrat. Balken: 40 µm

Bei allen drei untersuchten Patientinnen war in dem eutopen Endometrium das Enzym nur sehr schwach nachweisbar (Abb. 3.5. A, C, E), während in den Drüsenepithelien der ektopen Läsionen die Immunreaktion stärker war (Abb. 3.5 B, D, F). Es zeigte sich hier vor allem eine Färbung im apikalen Bereich.

3.2 Untersuchungen an in der Peritonealhöhle von Nacktmäusen kultivierten humanem Endometriumgewebe

3.2.1 Kultur von humanem Endometrium in zyklischen sowie in ovariectomierten, hormonsubstituierten Mäusen

Um zu untersuchen, über welchen Zeitraum die Expression der Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzyme in dem humanem Endometrium nach Transplantation in die Nacktmäuse detektiert werden kann, wurden die endometrialen Fragmente für 3-28 Tage in der Peritonealhöhle der Mäuse kultiviert. Um einen möglichen Einfluss des Hormonstatus der Tiere auf die Stärke der Expression der Rezeptoren und Enzyme im humanen Endometrium zu analysieren, wurden hormonbehandelte und unbehandelte normale zyklische, sowie hormonsubstituierte OVX Mäuse als Modell untersucht.

Serumhormonwerte und Uterusgewichte der Nacktmäuse

Der Hormonstatus der Mäuse wurde durch die Serumhormonwerte, die biologische Aktivität verschiedener E₂- und P-Konzentrationen durch die Bestimmung der Uterusgewichte bestimmt.

Östradiol- und Progesteronkonzentration im Serum der unterschiedlich behandelten Nacktmäuse

Um die mögliche Einwirkung des Hormonstatus der Mäuse auf die E₂- und P-Konzentration im Serum zu überprüfen, wurden unbehandelte und hormonbehandelte zyklische Tiere verwendet.

Unbehandelte zyklische Mäuse wiesen E_2 -Werte zwischen 9,3 und 63,4 pg/ml und P-Werte zwischen 0,1 und 19,7 ng/ml auf (Abb. 3.6 A, B). Eine Substitution mit E_2 führte bei diesen Tieren zu gleich bleibend höheren E_2 -Konzentrationen mit geringen Schwankungen über den Versuchszeitraum (64,4 pg/ml bis 83,4 pg/ml) (Abb. 3.6 A). Die Serum P-Konzentration war bei diesen Mäusen leicht erhöht (6,7 bis 26,3 ng/ml) (Abb. 3.6 B). Die Substitution der zyklischen Mäuse mit P führte zu keiner signifikanten Änderung der E_2 -Serumkonzentration (22,0 bis 44,5 pg/ml) (Abb. 3.6 A), hatte jedoch eine sehr starke Steigerung der Serumwerte für P zur Folge, die nach 14-tägiger Behandlung bis auf 2134,7 ng/ml anstiegen (Abb. 3.6 B). Diese waren aufgrund der hohen Variationen jedoch nicht signifikant.

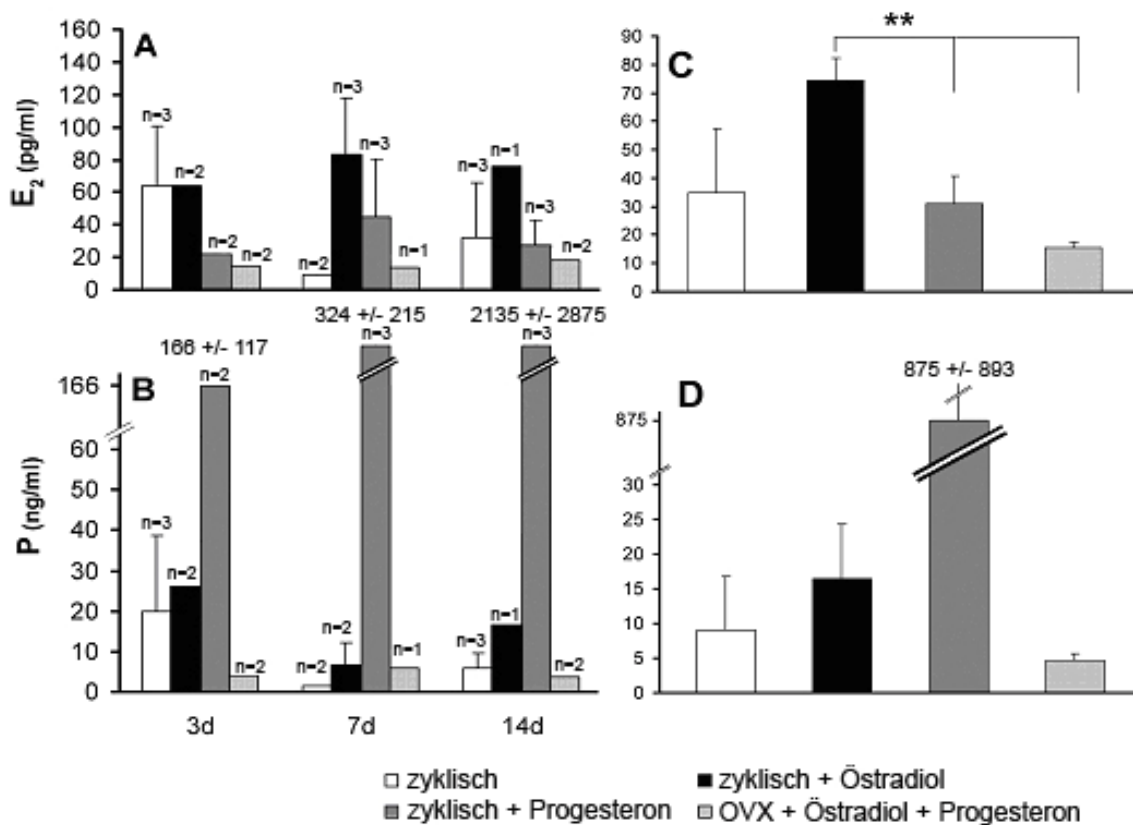


Abb. 3.6: Konzentrationen von E_2 und P im Serum über einen Zeitraum von 3 bis 14 Tagen (A, B) und Mittelwerte der Serumkonzentrationen von E_2 und P aller untersuchten Versuchszeitpunkte in unbehandelten zyklischen, sowie in hormonsubstituierten zyklischen und OVX Mäusen (C, D).

** = $p \leq 0,001$

Die mit E_2 und P substituierten, ovariectomierten Mäuse zeigten gleich bleibend geringe Serumkonzentrationen für E_2 und P (13,5 bis 18,3 pg/ml E_2 bzw. 2,0 bis 6,0 ng/ml P) (Abb. 3.6 A, B). Diese Ergebnisse für die Serumhormonwerte zeigen sich deutlicher in Abb. 3.6 C und D, in der jeweils die Mittelwerte für E_2 und P der Versuchsgruppen für die verschiedenen Versuchszeitpunkte zusammengefasst wurden.

Uterusgewichte unterschiedlich hormonsubstituierter Nacktmäuse

Um die Wirkung der applizierten Hormone auf den Uterus als Zielorgan zu überprüfen, wurden die Uterusgewichte der Mäuse an den einzelnen Tagen ermittelt (Abb. 3.7 A) sowie die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen über den gesamten Zeitraum dargestellt (Abb. 3.7 B).

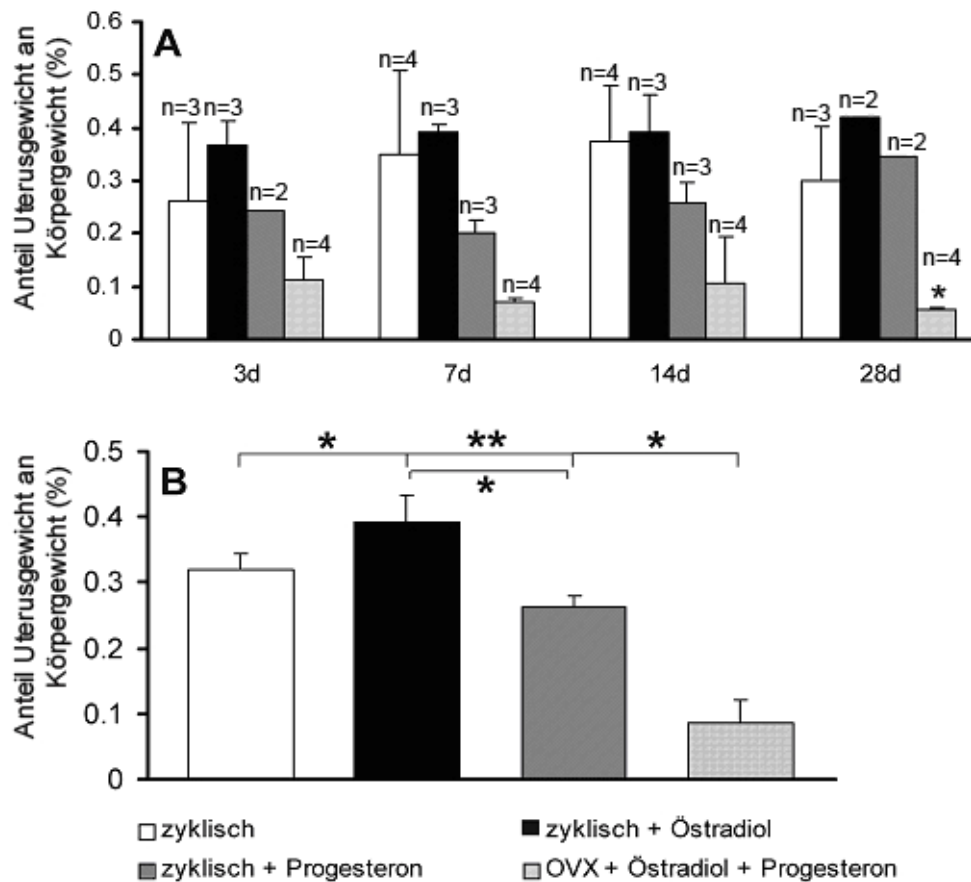


Abb. 3.7: Uterusgewichte von untersuchten Mäusen

A) Uterusgewichte der Tiere mit und ohne Hormongabe sowie von hormonsubstituierten OVX Mäusen nach einer Behandlungsdauer von bis zu 28 Tagen. * = $p \leq 0,05$ im Vergleich zu Tag 3

B) Übersicht über die Mittelwerte der Uterusgewichte aller Versuchszeitpunkte. * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,001$

Während die zusätzliche Gabe von E_2 zu einer Erhöhung des Uterusgewichtes führte, zeigten ovariectomierte Mäuse trotz Hormonsubstitution ein signifikant geringeres Uterusgewicht im Vergleich zu zyklischen Tieren (Abb. 3.7 A, B).

Expression von Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzymen in humanem Endometrium kultiviert in der Nacktmaus

Genexpression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren

Zunächst wurden die in der Maus kultivierten humanen Endometrien auf die Expression von ER α und PR (A+B) mit Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR Analyse in einem Zeitraum von 3-28 Tagen nach Transplantation untersucht. Es konnte die Transkription beider Steroidhormonrezeptoren über einen Kultivierungszeitraum von 28 Tagen in den Endometrien nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Die Expressionsstärke des ER α nahm mit Kulturdauer ab. Bei den unbehandelten zyklischen Mäusen ab Tag 7, bei den zyklischen mit E₂ behandelten und den hormonsubstituierten OVX Mäusen ab Tag 14 nach Transplantation im Vergleich zum untransplantierten Kontrollgewebe war das ER α Transkript signifikant abgesenkt (Abb. 3.8 A, C, G). Die Expression des PR (A+B) blieb während Kultur des Endometriums in zyklischen Mäusen bis 28 Tage erhalten (Abb. 3.8 B), nahm hingegen bei den hormonsubstituierten zyklischen und OVX Mäusen (Abb. 3.8 D, F, H) im Laufe der Kultur ab. Diese Reduktion des PR Transkriptes war bei den zyklischen mit E₂ behandelten Mäusen ab Tag 7 (Abb. 3.8 D) und bei den hormonsubstituierten OVX Mäusen ab Tag 3 (Abb. 3.8 H) signifikant.

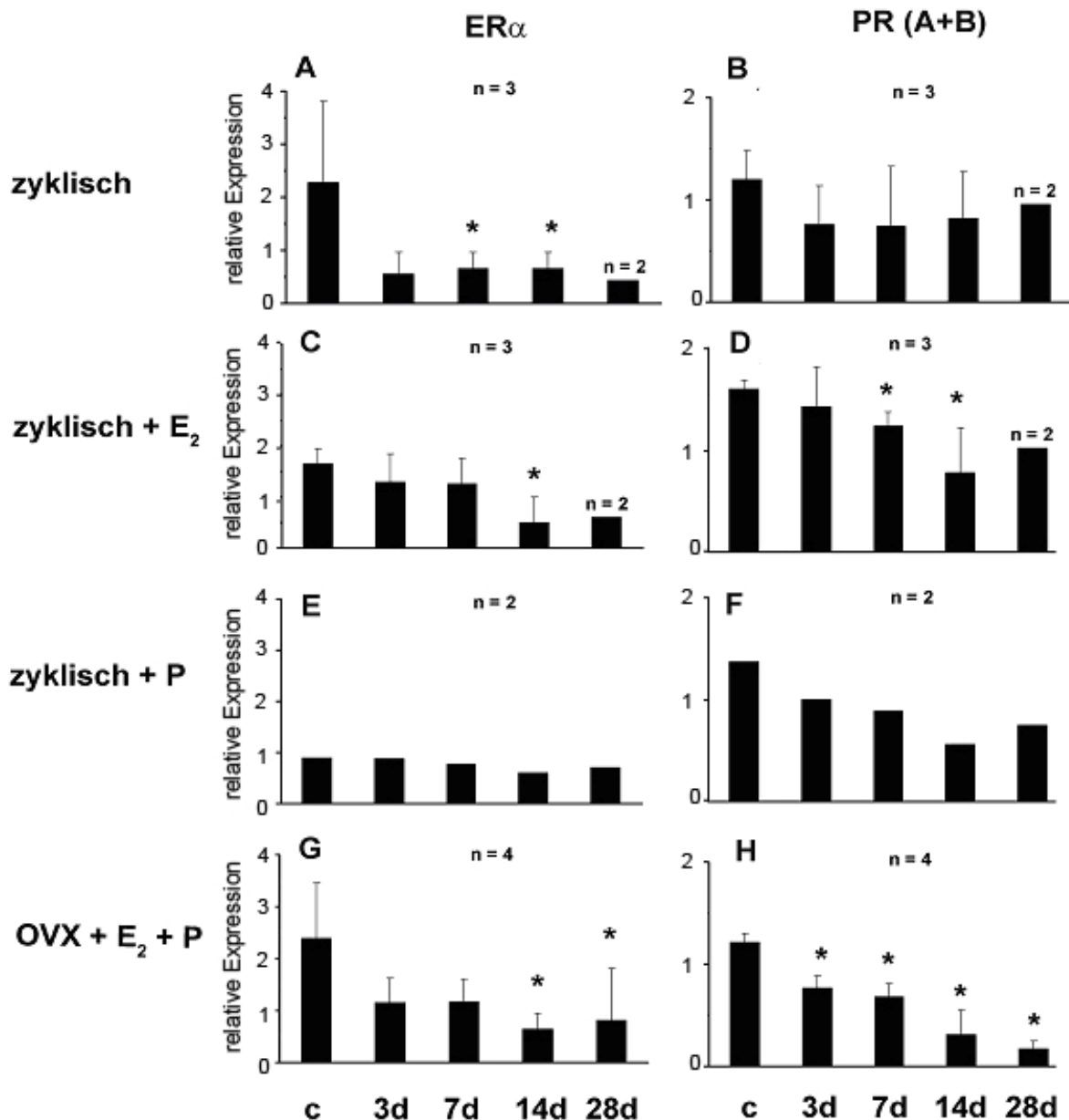


Abb. 3.8: RT-PCR Analyse von ER α und PR (A+B) in humanen endometrialen Fragmenten kultiviert in Nacktmäusen. Humanes eutopes Endometrium wurde für 3-28d in der Peritonealhöhle von Nacktmäusen kultiviert. Die Expression wurde verglichen mit der in untransplantierten Kontroll-Endometrien (c). Die Expression des ER α nahm in allen Versuchsreihen (A, C, E, G) mit Kulturdauer ab. PR (A+B) blieb in den Endometrien kultiviert in zyklischen Tieren konstant exprimiert (B), während die Expression in den anderen Versuchsgruppen abnahm (D, F, H). * = $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle

Um zu überprüfen, ob Endometrien von Frauen mit Endometriose eine veränderte Expression von Steroidhormonrezeptoren nach Kultur in der Nacktmaus haben, wurden die Resultate aus

Abb. 3.8 danach aufgeschlüsselt, ob die Patientinnen an Endometriose erkrankt waren oder nicht. Da sich die generelle Tendenz bezüglich der Expression der Steroidhormonrezeptoren in den unterschiedlich behandelten Mäusen nicht gravierend unterschied, wurden diese Ergebnisse aufgrund der geringen Fallzahlen in den einzelnen Versuchsreihen für die Ergebnisse von Patientinnen mit bzw. ohne Endometriose zusammengefasst (Abb. 3.9).

Die Expression der Transkripte von ER α und PR (A+B) nahm bei beiden Patientinnengruppen während der Kulturdauer in der Maus ab (Abb. 3.9 A, B). ER α war bei den Patientinnen mit Endometriose ab Tag 7 signifikant herunterreguliert (Abb. 3.9 A). Die Expression des PR (A+B) nahm bei den Patientinnen mit Endometriose ab Tag 14 und bei den Patientinnen ohne Endometriose ab Tag 3 nach Transplantation signifikant ab (Abb. 3.9 B). Trotz signifikanter Abnahme von ER α bei den Patientinnen mit Endometriose und der signifikanten Abnahme von PR (A+B) in den normalen Endometrien ist aufgrund der geringen Fallzahlen ein physiologischer Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht evident. Zudem weisen beide Kollektive die gleiche Tendenz zur Regulation, d.h. eine Abnahme der Expression der Steroidhormonrezeptoren auf.

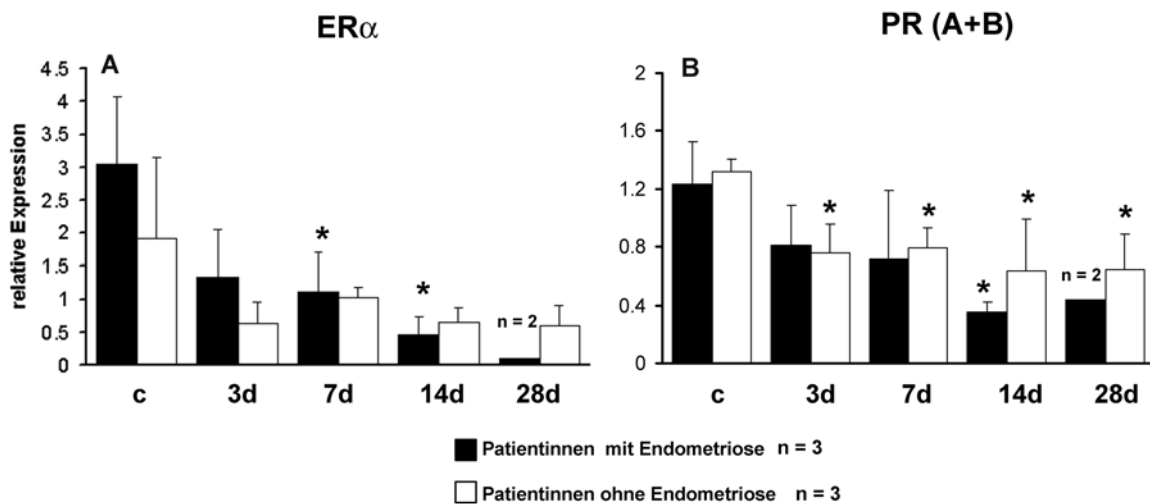


Abb. 3.9: RT-PCR Analyse von ER α und PR (A+B) in humanen endometrialen Fragmenten kultiviert für bis zu 28 Tagen in Nacktmäusen verglichen zu untransplantierten Kontroll-Endometrien (c).

* = $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle

Da für den ER β keine Genexpression im eutopen Endometrium nachgewiesen werden konnte, wurden zur Expression dieses Rezeptors keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Expression von Steroid-konvertierenden Enzymen

Es konnte gezeigt werden, dass die Transkripte der Steroid-konvertierenden Enzyme in den in Nacktmäusen kultivierten humanen endometrialen Fragmenten exprimiert werden (Abb. 3.10, 3.11).

Die Expression der 17 β Hydroxysteroid Dehydrogenasen nahm mit Kulturdauer in der Maus ab (Abb. 3.10). Hierbei war das Enzym 17 β HSD-1 in zyklischen (Abb. 3.10 A) und in hormonsubstituierten OVX Mäusen (Abb. 3.10 G) ab Tag 14 nach Transplantation signifikant im Vergleich zum untransplantierten Kontrollgewebe abgesenkt. 17 β HSD-2 war bei den zyklischen (Abb. 3.10 B) und bei den hormonsubstituierten OVX Mäusen (Abb. 3.10 H) ab Tag 7 und bei den mit E₂ behandelten zyklischen Tieren (Abb. 3.10 D) signifikant ab Tag 3 herunterreguliert.

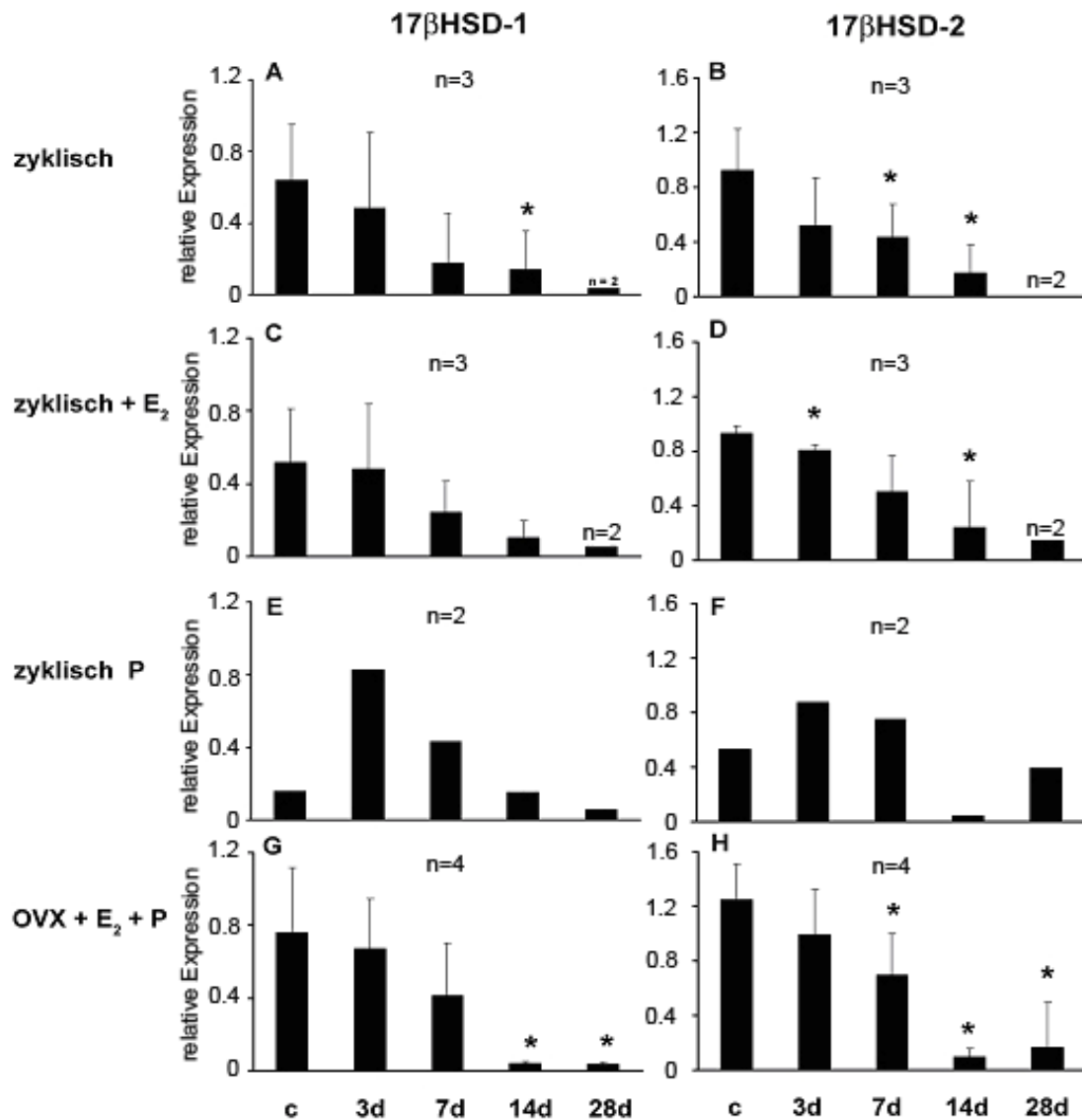


Abb. 3.10: RT-PCR Analyse von 17βHSD-1 und -2 in humanen endometrialen Fragmenten kultiviert für bis zu 28 Tagen in Nacktmäusen verglichen zu untransplantierten Kontroll-Endometrien (c).

A-B) Expression von 17βHSD-1 und -2 mRNA in Endometrien kultiviert in zyklischen Mäusen.

C-D) Expression der Transkripte in Endometrien kultiviert in zyklischen Mäusen nach 17β-Östradiol-Gabe.

E-F) Expression von 17βHSD-1 und -2 mRNA in Endometrien kultiviert in zyklischen Mäusen substituiert mit P.

G-H) Expression der Transkripte in Endometrien kultiviert in ovariectomierten und hormonsubstituierten Mäusen.

* = p ≤ 0,05 im Vergleich zur Kontrolle

Das Enzym Steroid Sulfatase (STS) blieb in den Endometrien kultiviert in zyklischen (Abb. 3.11 A) und in zyklischen mit P substituierten Tieren (Abb. 3.11 E) bis zu 28 Tage Kultur in der Maus erhalten, während die Transkripte in den Endometrien kultiviert in mit E₂ behandelten zyklischen (Abb. 3.11 C) und den hormonsubstituierten OVX Mäusen (Abb. 3.11 G) mit Kulturdauer abnahmen. Diese Absenkung war bei letzteren ab Tag 3 signifikant. Das Enzym Aromatase nahm in den Endometrien aus zyklischen Tieren (Abb. 3.11 B) nach 5 Tagen Kulturdauer ab, während die Transkripte in den hormonsubstituierten zyklischen (Abb. 3.11 D, F) und OVX Mäusen (Abb. 3.11 H) bis Tag 7 nach Transplantation im Vergleich zum Kontrollgewebe zunahm und anschließend stark herunterreguliert wurden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle Steroid-konvertierenden Enzyme im humanen Endometrium im Verlauf der Kultur in der Bauchhöhle konstant abnehmen und nach 7 Tagen nach Inokulation Versuche, die mit diesen Enzymen interagieren, keine Aussage mehr zulassen.

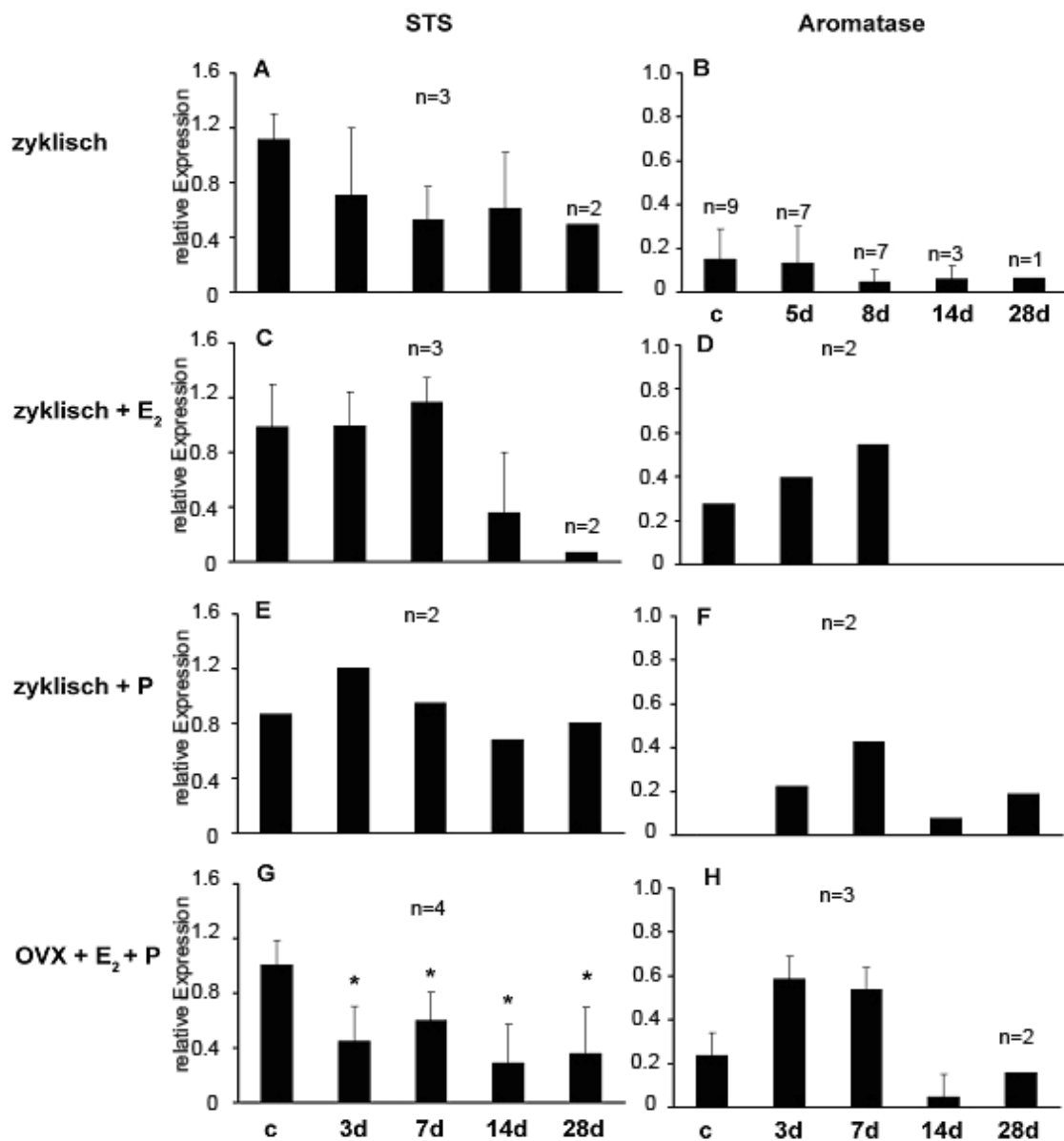


Abb. 3.11: RT-PCR Analyse von STS und Aromatase in humanen endometrialen Fragmenten kultiviert für bis zu 28 Tagen in Nacktmäusen verglichen zu untransplantierten Kontroll-Endometrien (c). * = $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle

A-B) Expression von STS und Aromatase mRNA in Endometrien kultiviert in zyklischen Mäusen.

C-D) Expression der Transkripte in Endometrien kultiviert in zyklischen Mäusen nach E₂-Gabe.

E-F) Expression von STS und Aromatase in Endometrien kultiviert in zyklischen, mit P substituierten Tieren

G-H) Expression der Transkripte in Endometrien kultiviert in ovariectomierten und hormonsubstituierten Mäusen.

Ebenso wie für die Steroidhormonrezeptoren wurden auch für die Expression der Steroid-konvertierenden Enzyme die Ergebnisse aus den unterschiedlich behandelten Mäusen zusammengefasst und nach den Endometrien von Patientinnen mit bzw. ohne Endometriose aufgeschlüsselt. Die Transkription der Enzyme 17 β HSD-1 und -2 (Abb. 3.12 A, B) war in den Endometrien der Patientinnen mit Endometriose ab Tag 14, bei den Patientinnen ohne Endometriose ab Tag 7 nach Transplantation signifikant im Vergleich zum eutopen Kontrollgewebe abgesenkt. Die Transkription der STS (Abb. 3.12 C) nahm in den Geweben beider Patientinnenkollektive ab Tag 14 der Kultur deutlich ab, diese Reduktion war im Endometrium der Patientinnen mit Endometriose signifikant. Das Enzym Aromatase (Abb. 3.12 D) blieb bei den Patientinnen mit Endometriose bis Tag 7 nach Transplantation konstant, während es bei den Patientinnen ohne Endometriose bis 7 Tage Kulturdauer in der Expression gesteigert wurde.

Ab Tag 14 war nur noch eine sehr geringe Expression der Aromatase in den untersuchten Geweben der beiden Patientinnengruppen nachweisbar.

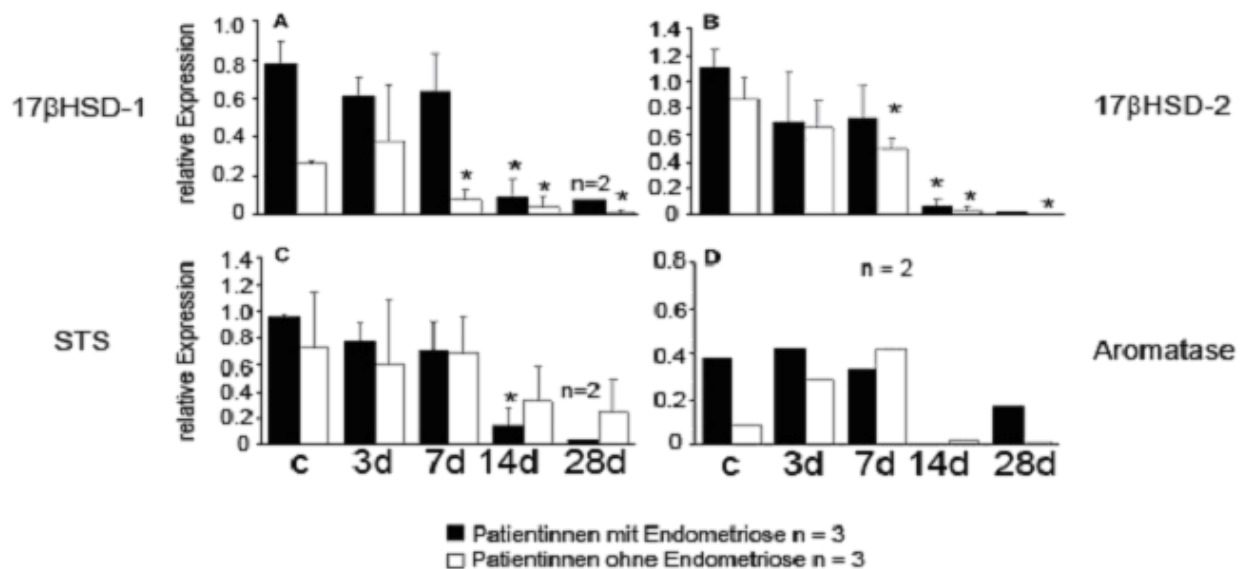


Abb. 3.12: RT-PCR Analysen von Steroid-konvertierenden Enzymen 17 β -HSD1 (A), 17 β -HSD2 (B), STS (C) und Aromatase (D) in humanen endometrialen Fragmenten von Patientinnen mit und ohne Endometriose kultiviert in Nacktmäusen.

* = $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (c)

Zusammenfassend zeigte sich vor allem innerhalb der ersten 7 Tage nach Transplantation tendenziell eine bessere Erhaltung von $ER\alpha$, der 17β Hydroxysteroid Dehydrogenasen sowie STS bei den Patientinnen mit Endometriose.

Immunhistochemische Lokalisation von Aromatase und 17β HSD-1

Mittels Immunhistochemie sollte untersucht werden, ob 17β HSD-1 und Aromatase in den humanen Fragmenten nach Kultur in der Nacktmaus auch auf Proteinebene detektiert werden können.

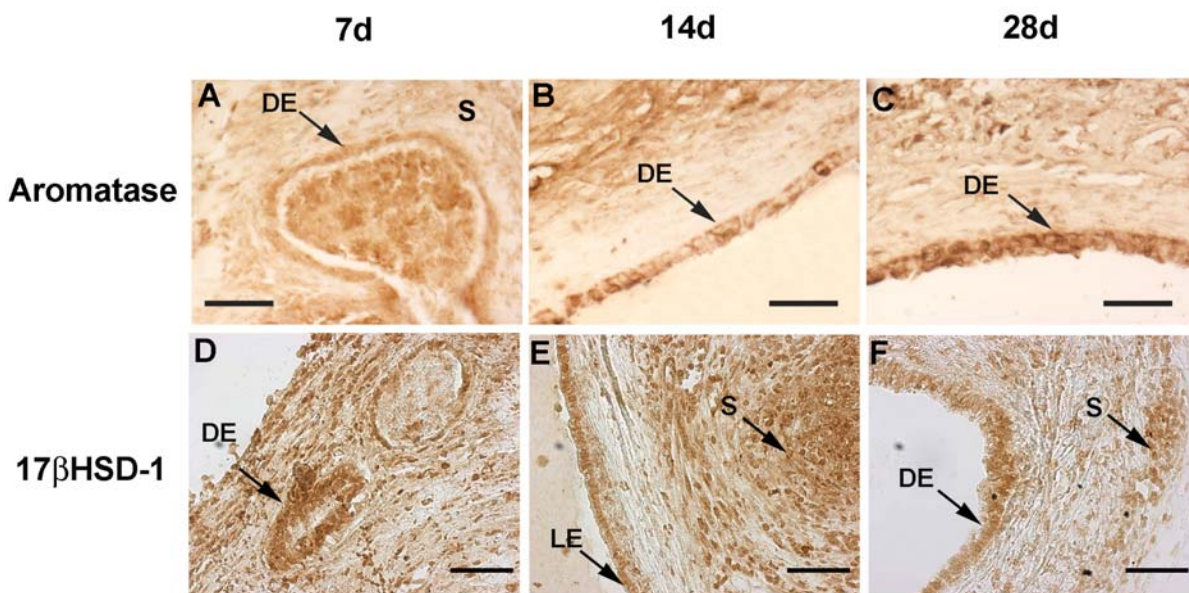


Abb. 3.13: Immunhistochemische Lokalisation von Aromatase und 17β HSD-1 in humanem Endometrium kultiviert für bis zu 28 Tage in Nacktmäusen.

A-C) Lokalisation von Aromatase in humanen Fragmenten transplantiert in zyklische Mäuse.

D-F) Lokalisation von 17β HSD-1 in humanem Endometrium kultiviert in ovariectomierten und hormonsubstituierten Nacktmäusen.

(DE) = Drüsenepithel, (LE) = luminales Epithel (S) = Stroma, Balken: 40 μ m

Die Aromatase konnte über den gesamten Versuchszeitraum in dem in zyklischen Mäusen kultivierten humanen Endometrium mit gleich bleibender Intensität in den Drüsenepithelien lokalisiert werden (Abb. 3.13 A-C). Im Stroma zeigte sich nur eine sehr schwache Immunreaktion (Abb. 3.13 A). Für 17 β HSD-1 zeigte sich eine Lokalisation des Enzyms in den Drüsenepithelien, dem luminalen Epithel sowie im Stroma des in hormonsubstituierten OVX Mäusen kultivierten Endometriums, die bis 28 Tage nach Transplantation konstant blieb (Abb. 3.13 D-F).

Expression von Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzymen von ektopen humanen Endometrioseherden kultiviert in der Nacktmaus

Um die Genexpression der Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzyme in eutopem versus ektopem Endometrium nach Kultur in der Nacktmaus zu vergleichen, wurden jeweils 4 Endometrioseherde in die Peritonealhöhle der Nacktmäuse transplantiert. Das Gewebe aus den Endometrioseherden wurde vor der Transplantation sowie nach 7 Tagen Kultur in zyklischen Nacktmäusen mittels RT-PCR untersucht. Die Transplantation erfolgte in zyklische unbehandelte Tiere. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Expression aller untersuchten Gene nach einer Woche Kultur im Vergleich zum Ausgangsgewebe (Abb. 3.14). Tendenziell war zu beobachten, dass die Expression von ER α (Abb. 3.14 A) und STS (Abb. 3.14 E) nach Kultur abnahm und die Transkription von 17 β HSD-2 (Abb. 3.14 D) gesteigert wurde. PR (A+B) (Abb. 3.14 B), 17 β HSD-1 (Abb. 3.14 C) und Aromatase (Abb. 3.14 F) zeigten hinsichtlich der Expression in den kultivierten ektopen Läsionen keine Unterschiede.

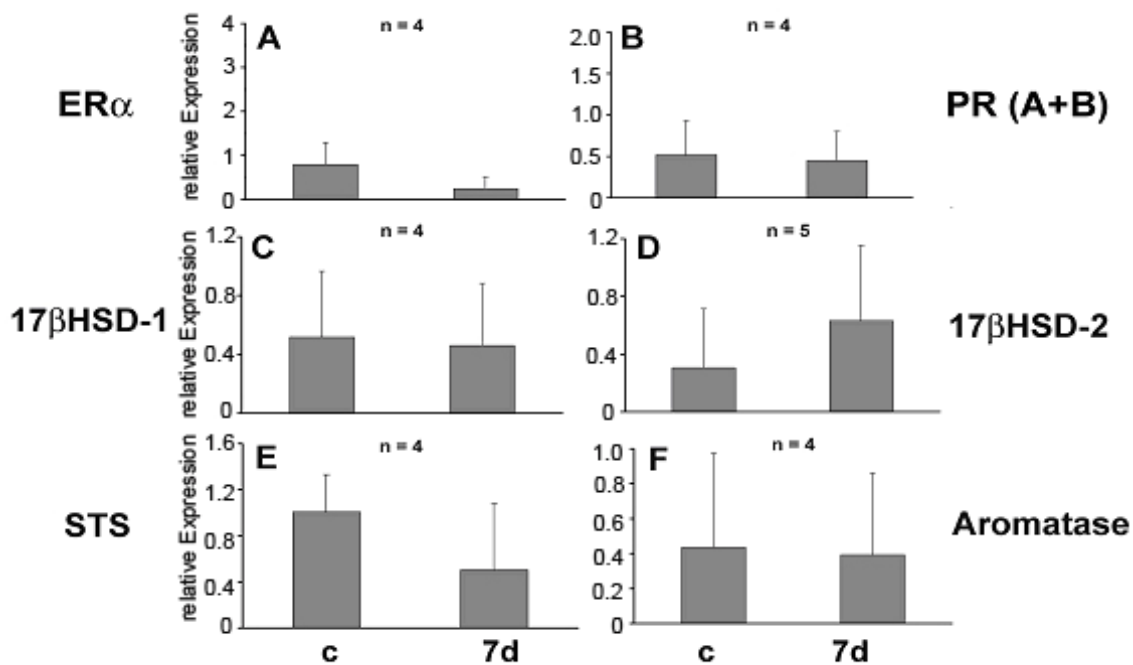


Abb. 3.14: RT-PCR Analyse von Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzymen in humanen Endometrioseherden kultiviert für 7 Tage in Nacktmäusen im Vergleich zum Ausgangsgewebe (c).

3.2.2 Expression von Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzymen in humanem Endometrium kultiviert in der Nacktmaus unter Einfluss von Pharmaka

Im Folgenden sollten die Wirkungen verschiedener in der Therapie eingesetzter Pharmaka (Tab. 3.1) auf die Expression Steroid-konvertierender Enzyme sowie Steroidhormonrezeptoren geprüft werden. Bei Kultur des eutopen Endometriums in Nacktmäusen nahm vor allem die Expression der 17 β Hydroxysteroid Dehydrogenasen mit Kulturdauer ab (Abb. 3.10). Diese Abnahme erfolgte jedoch erst deutlich ab 7 Tage Kulturdauer, so dass es bis zu diesem Zeitpunkt möglich ist, Untersuchungen zur Expression dieser Enzyme durchzuführen. Die Adhäsion von humanen Endometrien transplantiert in immunsupprimierte Mäuse erfolgt bereits ab Tag 2 nach Transplantation. Zudem konnte eine Neoangiogenese der Fragmente schon am 4. Kulturtag nachgewiesen werden (Grümmer et al. 2001), was eine Versorgung der implantierten Läsionen in mit verabreichten Substanzen gewährleistet. Somit wurde für die weiteren Untersuchungen zur

Testung der Wirkung von Substanzen an transplantierten Endometrien ein Zeitpunkt von 5 Tagen festgesetzt.

Tabelle 3.1: Wirkung verschiedener verwendeter bekannter Pharmaka

Substanz	Wirkung
Danazol	Androgen-ähnliche Wirkung
Dydrogesteron	Progesteron-ähnliche Wirkung
MPA	Progesteron-ähnliche Wirkung
Medrogeston	Progesteron-ähnliche Wirkung
Onapriston	Antiprogestin
Mifepriston	Antiprogestin
Cetrorelixacetat	GnRH-Antagonist
Finrozol	Aromatasehemmer

Direkte Effekte bekannter Pharmaka auf die Serumhormonwerte und Uterusgewichte der Nacktmäuse

Zunächst sollte die Wirkung von verschiedenen bekannten und bereits für unterschiedliche gynäkologische Erkrankungen eingesetzte Pharmaka auf die Nacktmäuse selbst untersucht werden. Dies erfolgte anhand der Analyse der Serumhormonwerte, der Zyklusstadien sowie der Uterusgewichte der Tiere.

Östradiol- und Progesteronkonzentrationen im Serum der mit Pharmaka behandelten Nacktmäuse

Von den Kontrolltieren sowie den mit dem synthetischen Androgen Danazol (2500 µg/d), dem Gestagen Dydrogesteron (50 µg/d) und dem Antiprogestin Onapriston (100 µg/d) behandelten Mäusen wurden die Serumwerte von E₂ und P analysiert (Abb. 3.15). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den behandelten Mäusen beobachtet werden. Tendenziell zeigte sich eine unter Behandlung aller 3 Substanzen eine leichte Steigerung

der Serumwerte an E_2 (Abb. 3.15 A, C, E), während keine Wirkungen auf die P-Konzentration im Serum zu verzeichnen war (Abb. 3.15 B, D, F).

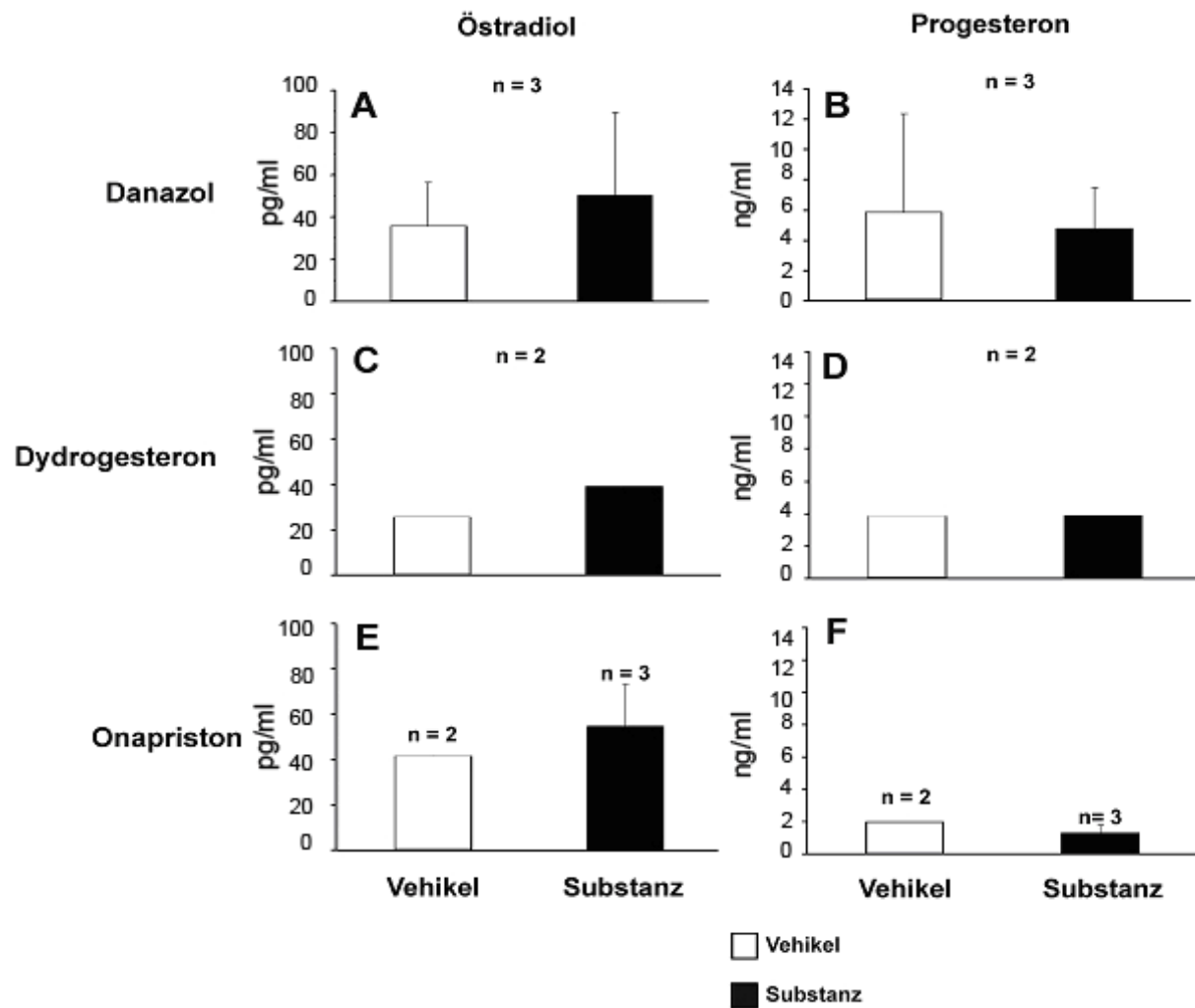


Abb. 3.15: Konzentration von E_2 (links) und P (rechts) im Serum von mit Danazol (A-B), Dydrogesteron (C-D) und Onapriston (E-F) behandelten Nacktmäusen nach 5 Tagen verglichen zur Kontrollgruppe behandelt mit Vehikel.

Zyklusstadien der mit Pharmaka behandelten Nacktmäuse

Um Wirkungen der verabreichten Substanzen auf den Zyklus der Mäuse festzustellen, wurde am Ende der Versuchsreihe jeweils das Zyklusstadium der für 5 Tage mit Vehikel oder Substanz behandelten Tiere dokumentiert. Es wurde zytologisch zwischen den Zyklusphasen Proöstrus,

Östrus, Metöstrus und Diöstrus differenziert. Die ausgewerteten Vaginalabstriche der mit bekannten Pharmaka behandelten Nacktmäuse sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Von mit den Gestagenen Dydrogesteron (10 µg/d) und MPA behandelten Tiere befanden sich im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Mäusen alle in der P-dominierten Zyklusphase Metöstrus bzw. Diöstrus. Von den mit Onapriston und Mifepriston behandelten Mäusen befand sich die Mehrheit (100% bzw. 83,3%) in der E₂ dominierenden Zyklusphase des Östrus. Die mit Cetrorelixacetat (10 µg/d) behandelten Tiere befanden sich alle im Östrus. Die Verabreichung der übrigen Substanzen führte zu keiner eindeutigen Zuordnung der Zyklusstadien der behandelten Mäuse.

Tabelle 3.2: Zyklusstadien von mit Vehikel und bekannten Pharmaka behandelten Nacktmäusen.

Substanz	n Mäuse	n Mäuse pro Zyklusstadium (%)			
		Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Diöstrus
Danazol 500 µg/d					
Vehikel	5	0	20	40	40
Substanz	3	0	33,3	66,6	0
Danazol 2500 µg/d					
Vehikel	3	0	0	33,3	66,6
Substanz	3	0	33,3	66,6	0
Dydrogesteron 10 µg/d					
Vehikel	7	0	43	14	43
Substanz	2	0	0	100	0
Dydrogesteron 50 µg/d					
Vehikel	3	0	33,3	66,6	0
Substanz	4	0	50	50	0
Onapriston 100 µg/d					
Vehikel	1	0	0	100	0
Substanz	2	0	100	0	0
Mifepriston 100 µg/d					
Vehikel	8	0	12,5	62,5	25
Substanz	6	0	83,3	16,7	0
MPA 50 µg/d					
Vehikel	5	0	40	40	20
Substanz	4	0	0	75	25
Medrogeston 50 µg/d					
Vehikel	4	0	0	75	25
Substanz	4	0	0	75	25
Cetrorelixacetat 1 µg/d					
Vehikel	4	0	25	50	25
Substanz	4	0	25	25	50
Cetrorelixacetat 10 µg/d					
Vehikel	4	25	0	50	25
Substanz	4	0	100	0	0
Finrozol 50 µg/d					
Vehikel	5	0	40	60	0
Substanz	3	0	33,3	33,3	33,3

Uterusgewichte der mit Pharmaka behandelten Nacktmäuse

Entsprechend der Verschiebung der Zyklusphase durch Cetrorelixacetat (10 µg/d) in den Daueröstrus (Tab. 3.2) nahm auch das Uterusgewicht durch die 5-tägige Verabreichung signifikant zu (Abb. 3.16 K). Nach Applikation von MPA war das Uterusgewicht signifikant reduziert (Abb. 3.16 F), obwohl eine eindeutige Verschiebung zum Diöstrus nicht zu verzeichnen war (Tab. 3.2).

Es zeigten sich keine weiteren signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Uterusgewichten der mit Vehikel behandelten Tiere. Tendenziell war zu beobachten, dass die Gabe von Finrozol, Danazol (500 µg/d), der Gestagene Dydrogesteron (10 µg/d) und Medrogeston sowie Onapriston zu einer Reduktion der Uterusgewichte führte (Abb. 3.16 A, B, D, G, H). Danazol in der Konzentration von 2500 µg/d steigerte das Uterusgewicht (Abb. 3.16 C), wogegen Dydrogesteron (50 µg/d), Mifepriston (100 µg/d) und Cetrorelixacetat (1 µg/d) keinen Einfluss zeigten (Abb. 3.16 E, I, J). Dass die Reduktion der Uterusgewichte bei Substanzen mit Progesteronwirkung nicht signifikant war, ist sehr wahrscheinlich auf die kurze Wirkzeit von 5 Tagen zurückzuführen.

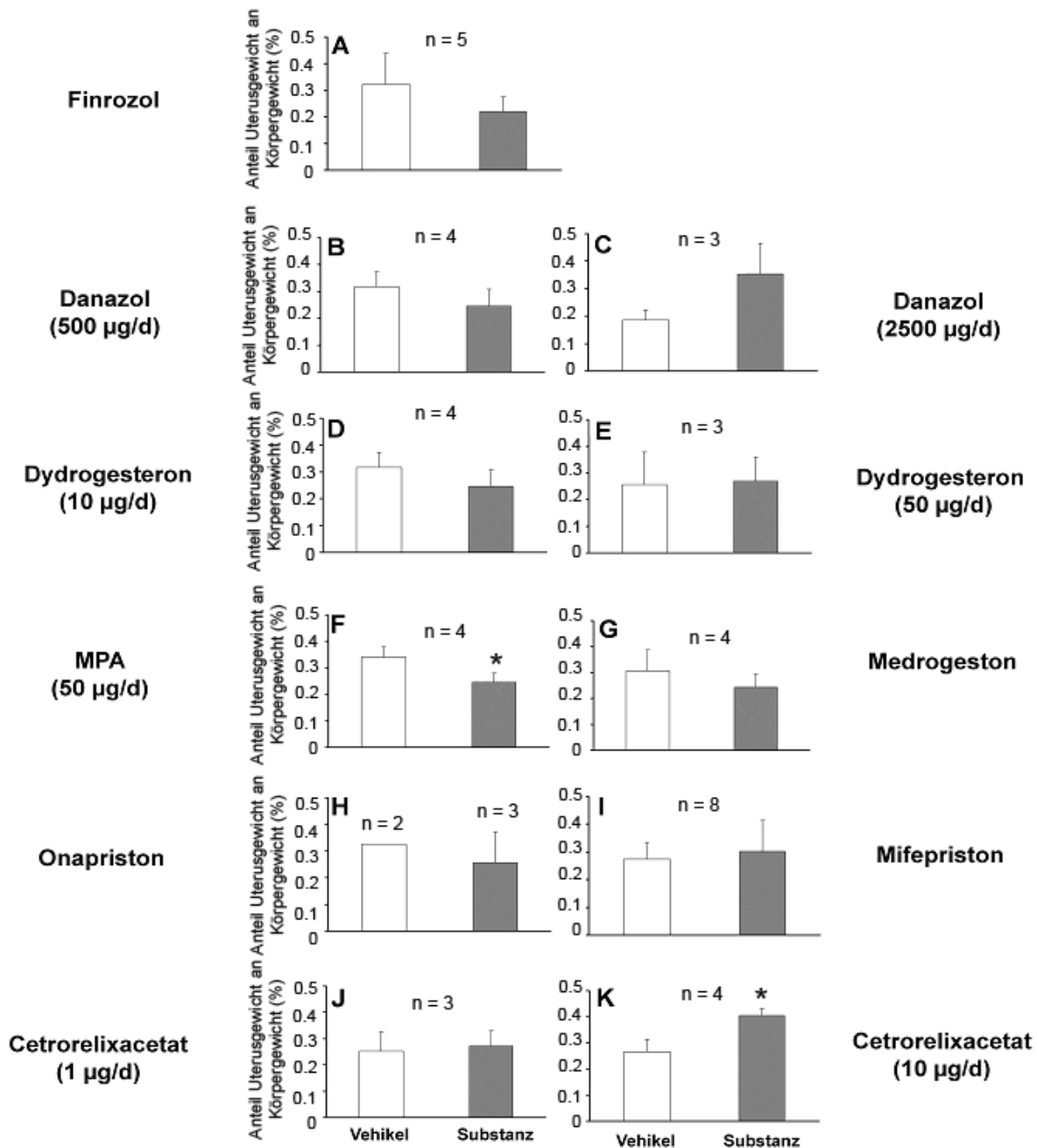


Abb. 3.16: Uterusgewichte der mit Vehikel und bekannten Pharmaka behandelten Nacktmäuse angegeben als prozentualer Anteil des Körpergewichtes der Tiere.

* = $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Vehikelkontrolle

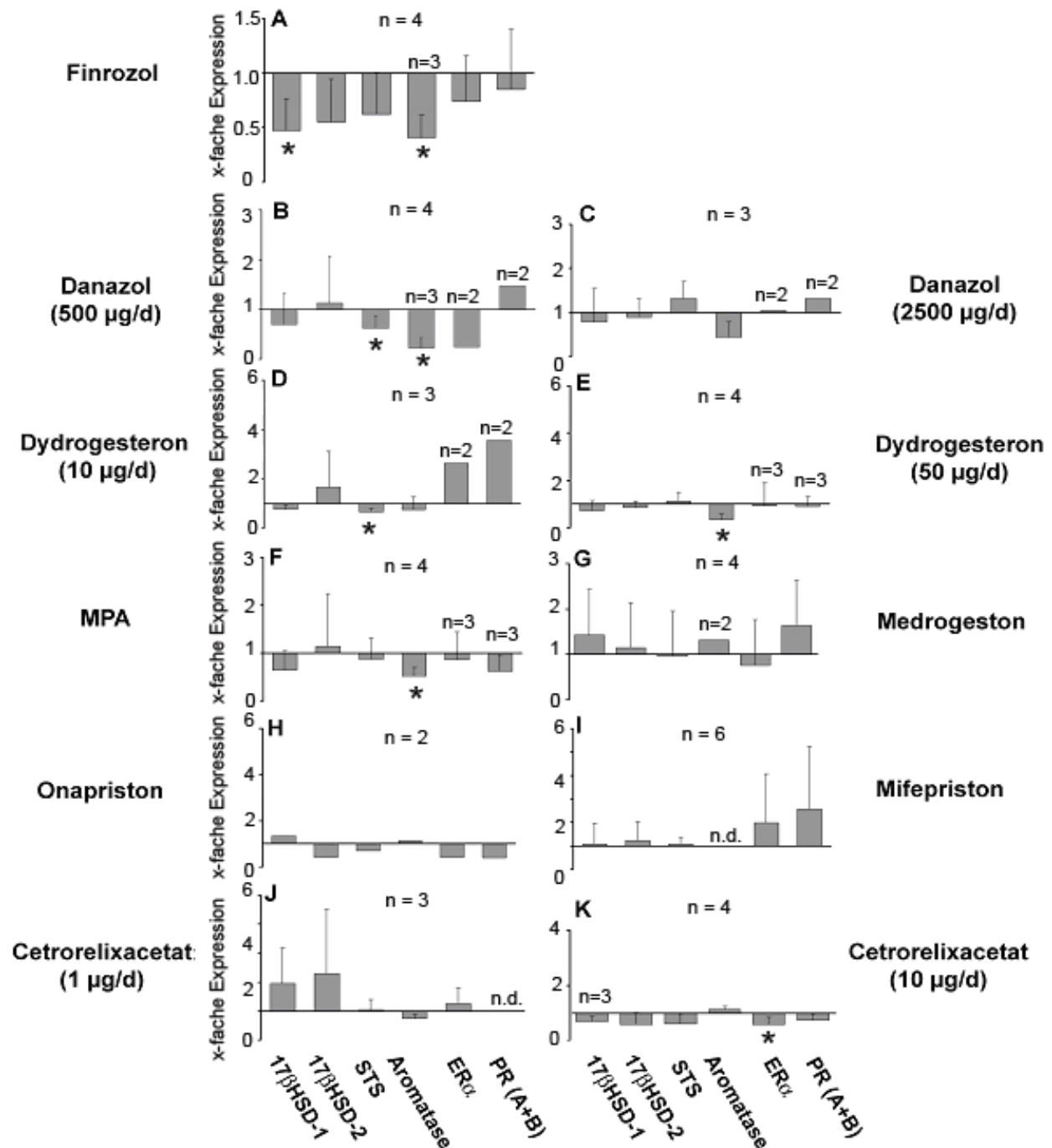
Effekte der verschiedenen bekannten Pharmaka auf die Steroid-konvertierenden Enzyme und Steroidhormonrezeptoren in humanem Endometrium

Um die Effekte der bekannten Pharmaka auf das in den Nacktmäusen kultivierte humane Endometrium zu untersuchen, wurde die Expression von Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzymen, die immunhistochemische Lokalisation der Aromatase, die Proliferation der transplantierten Fragmente sowie die Expression von E₂-sensitiven Genen in den Fragmenten analysiert.

Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie von Steroid-konvertierenden Enzymen im Endometrium

Die Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie von Steroid-konvertierenden Enzymen im Endometrium kultiviert in den mit bekannten Pharmaka behandelten Tieren wurde mittels quantitativer Real time RT-PCR untersucht und ist in Abb. 3.17 dargestellt.

In der Konzentration von 10 µg/d führte Cetrorelixacetat zu einer signifikanten Absenkung der Expression des ER α (Abb. 3.17 K). Die weiteren getesteten bekannten Pharmaka zeigten keine signifikanten Wirkungen auf die mRNA Expression von ER α und PR (A+B).



Die tägliche Injektion des Aromatasehemmers Finrozol resultierte in einer signifikanten Abnahme der Transkripte für die Enzyme 17 β HSD-1 und Aromatase (Abb. 3.17 A). Das synthetische Androgen und STS-Hemmer Danazol wurde in der für Mäuse umgerechneten physiologischen humanen Konzentration von 2500 μ g/d verabreicht (Abb. 3.17 C). Da sich bei Verwendung dieser Konzentration jedoch keine signifikanten mRNA Regulationen zeigten, wurde die Wirkung der Konzentration von 500 μ g/d (Abb. 3.17 B) ausgetestet. Die Verabreichung dieser Konzentration führte zu einer signifikanten Abnahme der Enzyme STS und Aromatase. Das Gestagen Dydrogesteron wurde den Mäusen zunächst als Konzentration von 50 μ g/d injiziert (Abb. 3.17 E), was in einer signifikanten Reduktion der Expression der Aromatase resultierte. Um eventuell zusätzlich eine Wirkung dieser Substanz auf die weiteren Steroid-konvertierenden Enzyme zu erzielen, wurde die Konzentration von 10 μ g/d (Abb. 3.17 D) zu den Untersuchungen hinzugezogen. In dieser Konzentration resultierte die Wirkung in einer signifikanten Reduktion der STS. Die für Mäuse umgerechnete physiologische humane Konzentration des GnRH-Antagonisten Cetrorelixacetat beträgt 1 μ g/d. Da bei Verabreichung dieser Konzentration (Abb. 3.17 J) keine signifikante Wirkung auf die mRNA Expression in den kultivierten Fragmenten erzielt werden konnte, wurden zusätzlich 10 μ g/d appliziert (Abb. 3.17 K). In dieser Konzentration zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf die mRNA Expression der untersuchten Enzyme. Unter Behandlung mit dem Gestagen MPA (Abb. 3.17 F) wurde ebenfalls die Transkription des Enzyms Aromatase signifikant reduziert, während durch die Verabreichung des Gestagens Medrogeston (Abb. 3.17 G) keine deutlichen mRNA Regulation erzielt werden konnten. Die Antiprogestine Onapriston (Abb. 3.17 H) und Mifepriston (Abb. 3.17 I) zeigten keine signifikanten Einflüsse auf die Expression der Steroid-konvertierenden Enzyme bzw. Steroidhormonrezeptoren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass verschiedene Konzentrationen von verabreichten Substanzen unterschiedliche Wirkungen auf die mRNA Expression in den in Nacktmäusen kultivierten Fragmenten aufwiesen. Durch die Verwendung von mehreren Substanzgruppen konnte eine vermehrte Reduktion der Transkription des Schlüsselenzyms der Östrogen-Synthese, der Aromatase erzielt werden (Finrozol: 59%, Danazol: 78%, Dydrogesteron: 67% und MPA: 48% Reduktion der Expression im Vergleich zur Expression in humanen Fragmenten aus den mit Vehikel behandelten Mäusen).

Immunhistochemische Lokalisation der Aromatase

Da die Behandlung mit Finrozol, Danazol, Dydrogesteron und MPA vor allem in einer signifikanten Reduktion des Schlüsselenzyms der Östrogen-Synthese, der Aromatase, resultierte (Abb. 3.17), sollte die Lokalisation der Aromatase in den in unbehandelten und behandelten Mäusen kultivierten humanen Läsionen immunhistochemisch untersucht werden. Für diese Analysen war eine ausreichende Anzahl an Drüsenanschnitten erforderlich. Da dies nicht bei allen Fragmenten der Fall war, wurden für die Untersuchungen Schnitte von Läsionen kultiviert in Mäusen ausgewählt, die in mit dem Aromatasehemmer Finrozol, mit dem Gestagen MPA und dem synthetischen Androgen Danazol (500 µg/d) behandelt wurden.

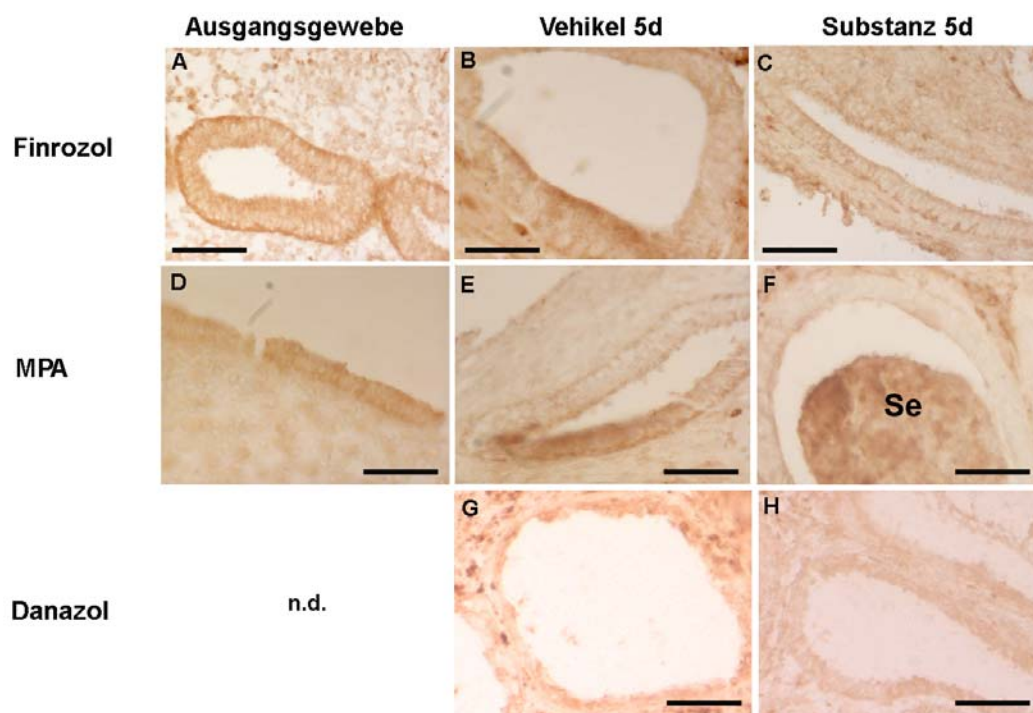


Abb. 3.18: Immunhistochemische Lokalisation der Aromatase in untransplantierten eutopen Endometrien sowie in Endometrien kultiviert in für 5 Tage mit Vehikel und Substanz behandelten Nacktmäusen.

Se = Drüsensekret; Balken: in A, C: 80 µm, in B, D, E, F, G, H: 40 µm

Es konnte eine Immunreaktion in den Drüsenepithelien der untransplantierten Ausgangsgewebe (Abb. 3.18 A, D) sowie der Drüsenepithelien von Läsionen aus mit Vehikel behandelten Mäusen

(Abb. 3.18 B, E, G) detektiert werden, die eine deutliche Differenzierung zwischen Epithel- und Stromagewebe ermöglicht. In den Läsionen aus mit Substanz-behandelten Mäusen ist eine klare Immunreaktion nicht mehr detektierbar.

Proliferationsrate in den humanen Endometrien

Da es bisher methodisch nicht möglich ist, die Konzentrationen an E_2 und Östron in den sehr kleinen kultivierten humanen Fragmenten zu bestimmen, wurde die Proliferation der Drüsenepithelien als Marker für östrogene Wirkung innerhalb der Läsionen untersucht. Die Analyse der Proliferation von humanem Endometrium kultiviert in mit Vehikel und Substanz-behandelten Nacktmäusen erfolgte durch Inkubation der Paraffinschnitte mit dem Proliferationsmarker Ki67. Die Anzahl der Ki67 gefärbten Zellkerne der Drüsenepithelien wurden im Verhältnis zur Gesamtzahl der Epithelzellkerne (gefärbt mit Hämatoxylin) ausgezählt und die prozentuale Proliferationsrate ermittelt (Abb. 3.19).

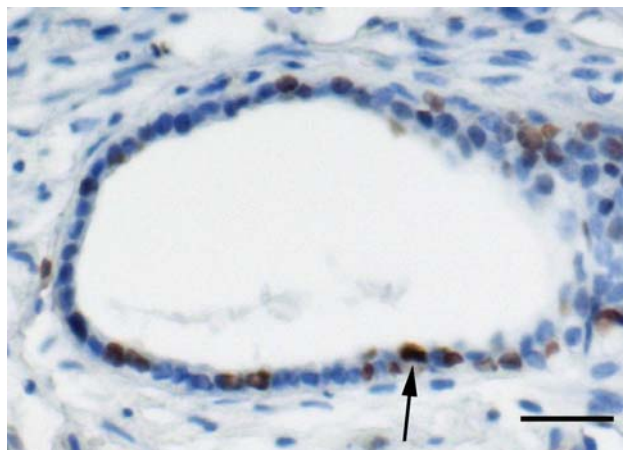


Abb. 3.19: Nachweis der Proliferation in einem 5 Tage in der Maus kultivierten humanem Endometrium-Fragment durch Ki67 mit anschließender Gegenfärbung. Die Zellkerne sind blau, die proliferierenden Zellkerne braun (Pfeil) angefärbt. Balken: 40 μm

Es wurde der Effekt von Danazol (500 $\mu\text{g/d}$), Dydrogesteron (50 $\mu\text{g/d}$) MPA (50 $\mu\text{g/d}$), Cetrorelixacetat (10 $\mu\text{g/d}$) und Finrozol (50 $\mu\text{g/d}$) auf die Proliferation von humanem

Endometrium nach 5 Tagen Kultur in zyklischen Nacktmäusen untersucht. Die Auswertung der Versuche ist in Abb. 3.20 dargestellt.

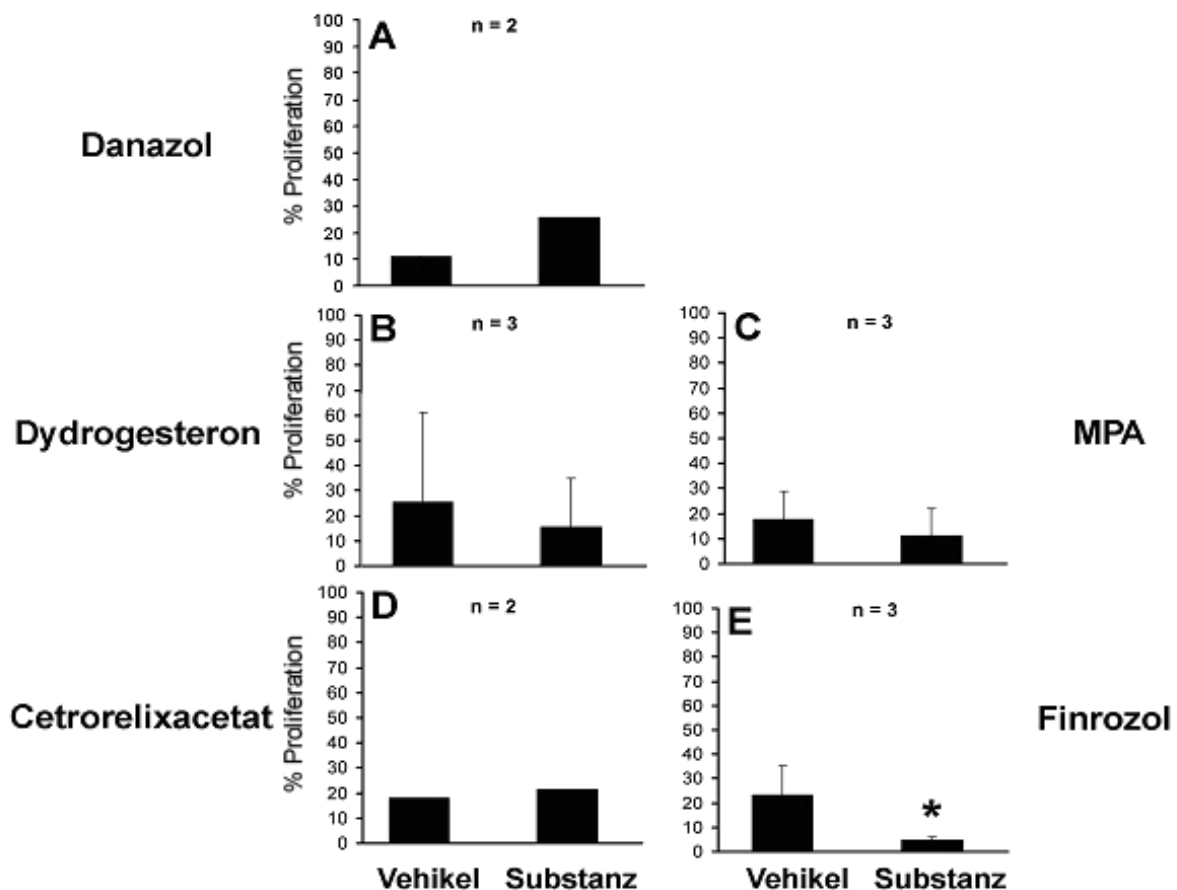


Abb. 3.20: Proliferation von humanem Endometrium kultiviert in mit verschiedenen bekannten Pharmaka behandelten Nacktmäusen. Dargestellt ist die Proliferation in Endometrien aus mit Vehikel behandelten Mäusen (Vehikel) und in Endometrien aus mit Pharmaka behandelten Tieren (Substanz).

* = $p \leq 0,05$

Nach Transplantation in die Nacktmaus lag die Proliferation in den untersuchten Geweben aus den Vehikeltieren zwischen 11,5 und 23,2%. Die Substanz Finrozol (Abb. 3.20 E) zeigte den größten hemmenden Effekt und reduzierte die Proliferation des kultivierten humanen

Endometriums signifikant um 18,7%. MPA (Abb. 3.20 C) reduzierte die Proliferation der Drüsenepithelien in humanem Gewebe um 6,4% und Dydrogesteron (Abb. 3.20 B) um 9,7%, während die 5-tägige Behandlung mit Danazol (Abb. 3.20 A) die Proliferation in den Fragmenten um 14,6% steigerte. Die Verabreichung von Cetrorelixacetat (Abb. 3.20 D) hatte keinen Einfluss auf die Proliferation des humanen Gewebes.

Expression Östradiol-sensitiver Gene in den humanen Endometrien

Da es methodisch nicht möglich ist, die E_2 -Konzentration in den kultivierten endometrialen Fragmenten zu bestimmen, sollte die Expression der Östrogen-sensitiven Gene für die Connexine Cx26 und Cx43 sowie für Cyr61 als indirekter Marker für einen östrogenen Effekt in den transplantierten endometrialen Fragmenten verwendet werden. Eine Östrogen-abhängige Expression von Cx26 und Cx43 (Jahn et al. 1995) sowie von Cyr61 (Absenger et al. 2004) konnte bereits im humanen Endometrium demonstriert werden. Die Gestagene Dydrogesteron und MPA (jeweils 50 $\mu\text{g/d}$) zeigten einen reduzierenden Einfluss auf die mRNA Expression der Aromatase (Abb. 3.17 E, F) wogegen Finrozol (Abb. 3.17 A) signifikant die mRNA Expression von 17 β HSD-1 und der Aromatase reduzierte. Durch die transkriptionelle Inhibierung der E_2 -synthetisierenden Enzyme sollte es so zu einer geringeren Konzentration an E_2 und folglich zu einer verminderten Expression der Östrogen-sensitiven Gene in den kultivierten Läsionen kommen. Durch Cetrorelixacetat (10 $\mu\text{g/d}$) (Abb. 3.17 K) kam es zu einer signifikanten Reduktion von $ER\alpha$ Transkripten in den kultivierten humanen Läsionen, aber dennoch zu einer signifikanten Steigerung der Uterusgewichte der behandelten Mäuse (Abb. 3.16 K). Hier wäre es interessant zu untersuchen, ob sich die Wirkung nur auf den Organismus der Maus beschränkt oder auch auf die Verhältnisse innerhalb der humanen Läsionen übertragbar ist. Um dies zu verifizieren, wurden für die weiteren Untersuchungen Fragmente aus mit diesen Substanzen behandelten Mäusen ausgewählt.

Für die Connexine Cx26 und Cx43 zeigte sich nach Behandlung mit Dydrogesteron, MPA, Cetrorelixacetat und Finrozol (Abb. 3.21 A, B, C, D) keine eindeutige abhängige Regulation. Cyr61 wurde hingegen durch Dydrogesteron (Abb. 3.21 A), welches eine Progesteron-ähnliche Wirkung hat, abgesenkt. Ebenfalls wurde es durch Behandlung mit dem anti-östrogen wirksamen

Aromatasehemmer Finrozol (Abb. 3.21 D) signifikant in den kultivierten humanen Fragmenten herunterreguliert. Die Anwendung des GnRH-Antagonisten Cetrorelixacetat im Mausmodell weist auf eine östrogene Wirkung hin (s.o.). Diese Beobachtung wird durch die Hochregulation von Cyr61 in den kultivierten humanen Fragmenten aus mit Cetrorelixacetat (Abb. 3.21 C) behandelten Mäusen bestärkt. Die Verabreichung von MPA zeigte auf die Genexpression von Cyr61 in dem kultivierten humanen Endometrium keinen Einfluss.

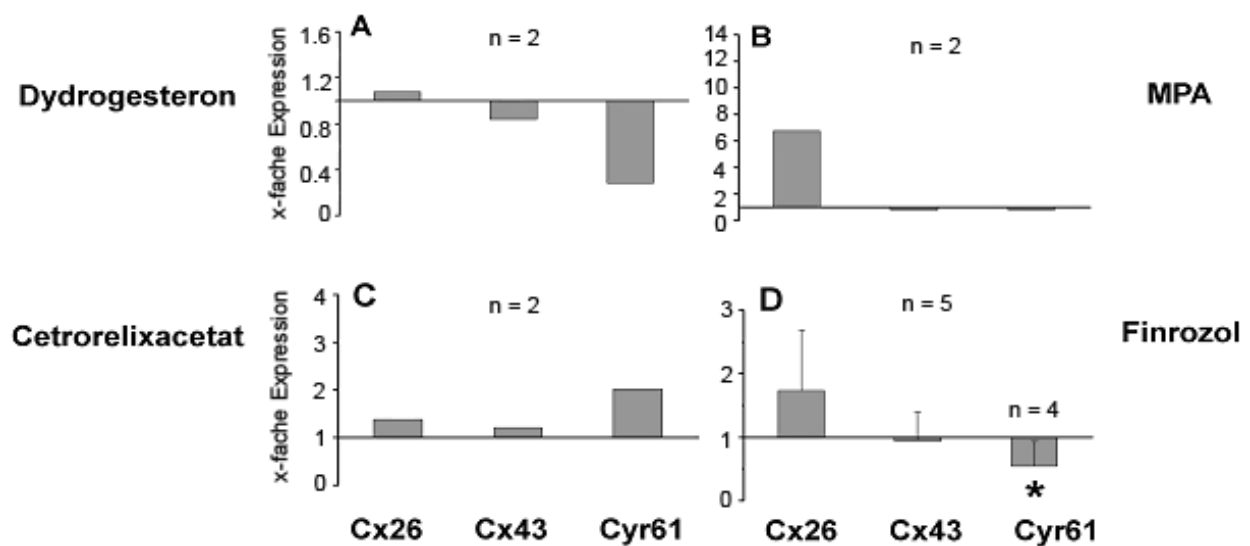


Abb. 3.21: Real-Time PCR der Expression von E₂-sensitiven Genen in humanem Endometrium kultiviert für 5 Tage in mit verschiedenen bekannten Substanzen behandelten Nacktmäusen.

Die Werte der mit Vehikel behandelten Tiere wurden gleich 1 gesetzt.

* = $p \leq 0,05$

Somit scheint Cyr61 der einzige der untersuchten Marker für die E₂-Konzentration in den kultivierten humanen Fragmenten zu sein, der trotz geringer Fallzahlen deutliche Tendenzen der mRNA Regulation anzeigt.

3.2.3 Kultur von humanem Endometrium in mit Testsubstanzen behandelten Nacktmäusen

Effekte der Testsubstanzen auf die Nacktmäuse

Der Einfluss der verabreichten unbekannten Testsubstanzen B10719933, B10715942, B10720840 und B10720440 auf die Nacktmäuse sollte durch die Bestimmung der Zyklusstadien sowie der Uterus- und Nebennierengewichte der Tiere untersucht werden.

Zyklusstadien der mit Testsubstanzen behandelten Nacktmäuse

Bei allen Versuchstieren wurde nach 5 Tagen Behandlung mit Vehikel bzw. Testsubstanz das Zyklusstadium mittels Vaginalabstrich bestimmt. Die Behandlung mit Testsubstanzen hatte keinen eindeutigen Einfluss auf die Zyklusphasen der Mäuse (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Zyklusstadien von mit Vehikel und Testsubstanzen behandelten Nacktmäusen.

Substanz	n Mäuse	n Mäuse pro Zyklusstadium (%)			
		Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Diöstrus
B10719933					
Vehikel	8	0	50	50	0
Substanz	6	0	33,3	33,3	33,3
B10715942					
Vehikel	8	12,5	50	37,5	0
Substanz	6	0	50	33,3	16,7
B10720840					
Vehikel	4	0	25	25	50
Substanz	2	0	50	50	0
B10720440					
Vehikel	4	0	25	50	25
Substanz	2	0	50	50	0

Uterus- und Nebennierengewichte der mit Testsubstanzen behandelten Nacktmäuse

E₂ wird neben der Bildung in den Ovarien, Corpus Luteum und der Plazenta vor allem in den Nebennieren gebildet. Das Gewicht der Nebennieren ist somit neben dem Uterusgewicht ein Indikator für eine lokale Wirkung von E₂. Keine der untersuchten Testsubstanzen hatte nach 5

Tagen Behandlungsdauer einen signifikanten Einfluss auf das Gewicht von Uterus und Nebennieren der Versuchstiere (Abb. 3.22). Einen tendenziell reduzierenden Effekt auf das Uterusgewicht zeigten die Substanzen B10719933, B10715942 und B10720440 (Abb. 3.22 A, B, E). Einen tendenziell absenkenden Einfluss auf das Nebennierengewicht hatte die Substanz B10720440 (Abb. 3.22 F).

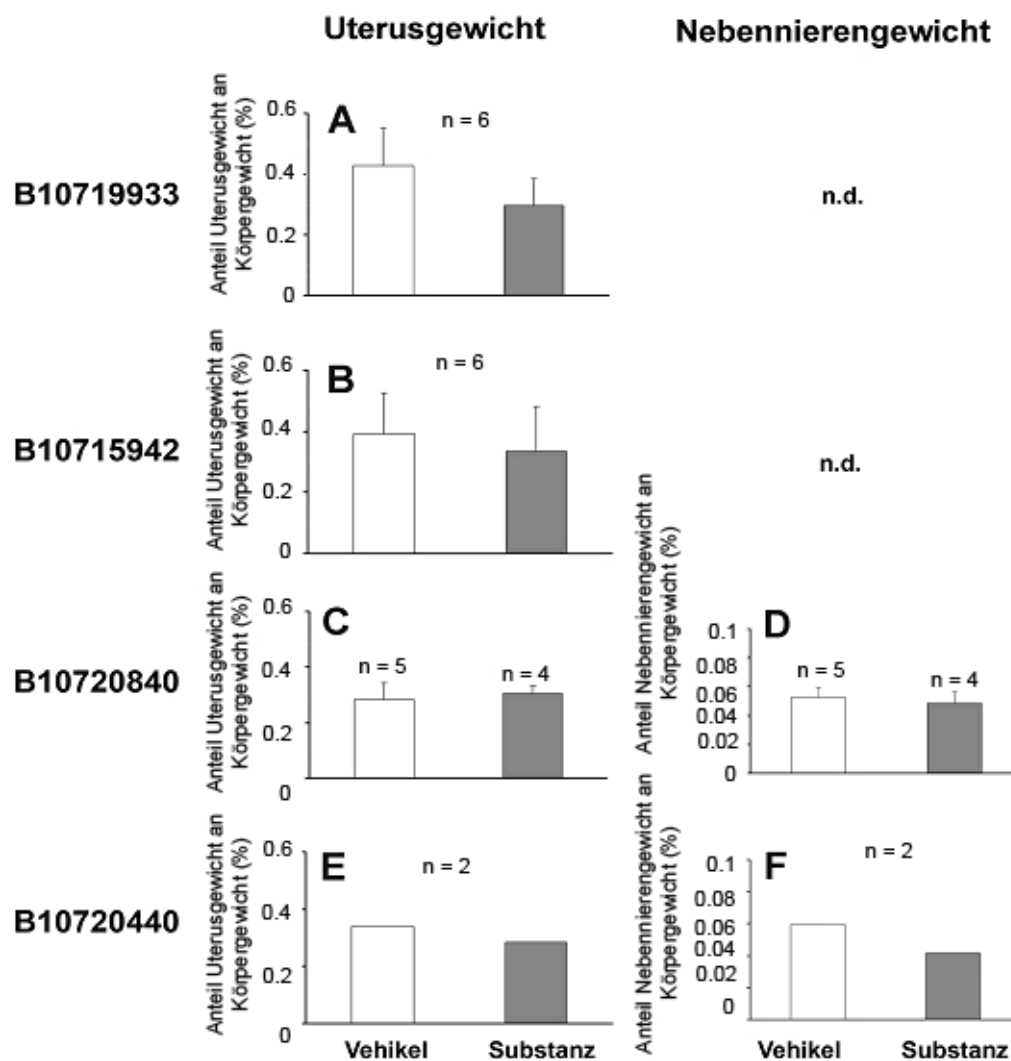


Abb. 3.22: Uterus- und Nebennierengewichte der mit Vehikel und Testsubstanzen behandelten Nacktmäuse angegeben als prozentualer Anteil des Körpergewichtes der Tiere.

Effekte der Testsubstanzen auf die Expression von Steroidhormonrezeptoren sowie von Steroid-konvertierenden Enzymen in dem in den Nacktmäusen kultivierten humanem Endometrium

Der Effekt der unbekannten Testsubstanzen auf das transplantierte Endometrium sollte durch Untersuchung der mRNA Expression von Steroidhormonrezeptoren sowie Steroid-konvertierenden Enzymen analysiert werden. Dies erfolgte mittels quantitativer Real time RT-PCR und die Resultate sind in Abb. 3.23 zusammengefasst.

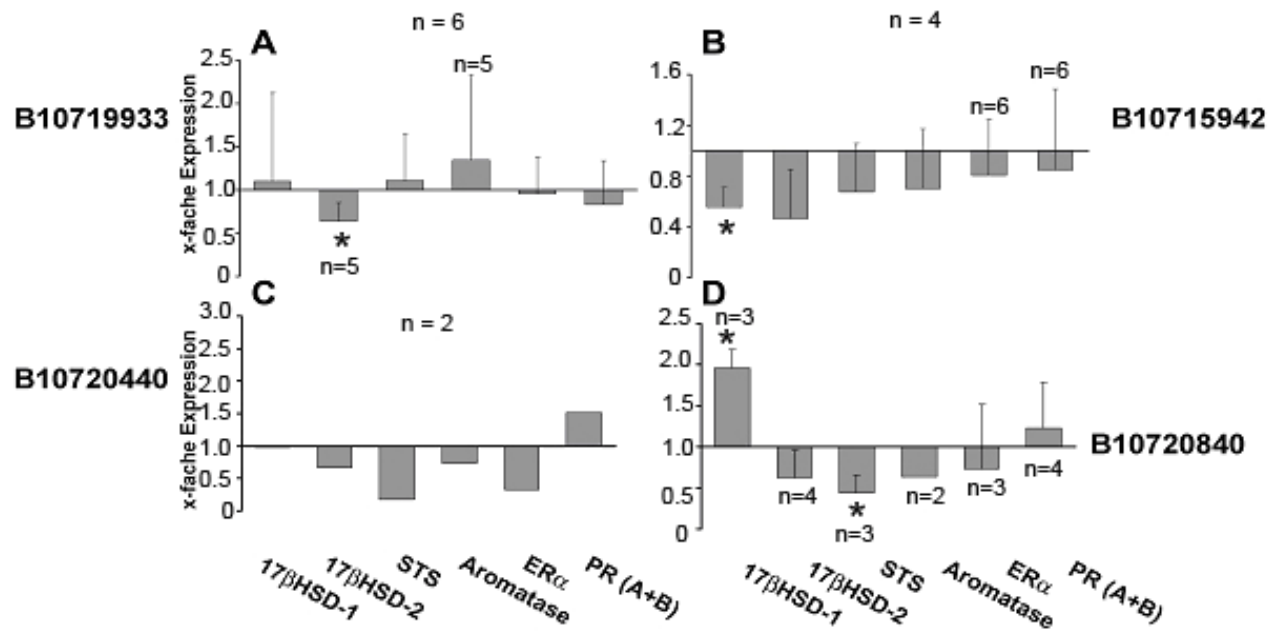


Abb. 3.23: Wirkungen von Testsubstanzen auf die Genregulation von Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzymen in humanem Endometrium kultiviert in der Nacktmaus.

Die Werte der mit Vehikel behandelten Tiere wurden gleich 1 gesetzt.

* = $p \leq 0,05$

Unter Behandlung mit der Substanz B10719933 (Abb. 3.23 A) kam es in dem kultivierten humanem Endometrium zu einer signifikanten Herabsenkung von 17 β HSD-2 Transkripten. Die Substanz B10715942 (Abb. 3.23 B) reduzierte signifikant die Expression von 17 β HSD-1, während alle weiteren untersuchten Steroid-konvertierenden Enzyme und Steroidhormonrezeptoren in der Expression nur tendenziell abgesenkt wurden. Die Substanz B10720840 (Abb. 3.23 D) führte zu einer signifikanten Steigerung von 17 β HSD-1- und einer signifikanten Herabsenkung von STS Transkripten, während durch die Substanz B10720440 die Expression von STS und ER α leicht reduziert wurde (Abb. 3.23 C).

4. Diskussion

Die molekularen Mechanismen der Pathogenese der Endometriose sind bis heute ungeklärt. Es gibt jedoch konkrete Hinweise darauf, dass ein Ungleichgewicht der Expression von Steroidhormonrezeptoren und E_2 -konvertierenden Enzymen in den ektopen Läsionen die Entstehung und Persistenz der Endometriose unterstützt (Attar & Bulun 2006). Deswegen ist es Ziel neuer Therapieansätze, die Expression dieser Enzyme zu hemmen. Hier in der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass dieses Modell für die Testung neuer Therapieansätze, die mit dem Östrogenmetabolismus interagieren, geeignet zu sein scheint.

4.1 Steroidhormonrezeptoren und Östrogenbiosynthese im Endometrium von gesunden und an Endometriose erkrankten Frauen

Als einer der Hauptfaktoren für das Wachstum von endometriotischen Läsionen werden Östrogene diskutiert. Die Wirkung des in den Ovarien produzierten Östrogens und P wird durch den Östrogenrezeptor α und β bzw. über den Progesteronrezeptor A und B vermittelt (Noe et al. 1999). Die Steroidhormonrezeptoren wirken als Transkriptionsfaktoren und können durch Diffusion in den Nukleus die Transkription von bestimmten Genen induzieren.

Es ist bekannt, dass in eutopen Endometrien die Steroidhormonrezeptoren $ER\alpha$ und PR exprimiert werden (Brandenberger et al. 1999; Fujimoto et al. 1999). Dies konnte durch den Nachweis dieser Rezeptoren mittels Real-Time PCR im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Patientinnen mit Endometriose zeigen sowohl in der Proliferations- als auch in der Sekretionsphase eine leicht erhöhte Anzahl an $ER\alpha$ Transkripten. Da bekannt ist, dass Östrogene die Stabilität der ER mRNA regulieren (Mitchell & Ing 2003), könnte das Endometrium dieser Patientinnen eine erhöhte Sensitivität gegenüber E_2 aufweisen.

In Bezug auf den PR wurden beide Subtypen A+B in der vorliegenden Arbeit gemeinsam untersucht. Der PR war in der Proliferationsphase bei beiden Patientinnengruppen deutlich stärker exprimiert als in der Sekretionsphase. Dies spiegelt die Resultate früherer Arbeiten wider,

in denen die Proteinmengen von ER α sowie von PR in der Proliferationsphase deutlich höher als in der Sekretionsphase waren (Barile & Bompiani 1977; Bayard et al. 1978). In der vorliegenden Arbeit war im Endometrium der Patientinnen mit Endometriose der PR in der Proliferationsphase signifikant geringer exprimiert als im Endometrium von Patientinnen ohne Endometriose. Diese geringere Expression kann für eine geringere P-Sensitivität des Endometriums dieser Frauen verantwortlich sein. Dies ähnelt der Expression von PR in endometriotischen Läsionen, in denen im Vergleich zum eutopen Endometrium die P-Sensitivität durch eine geringere Expression von PR herunterreguliert ist (Prentice et al. 1992).

Kürzlich konnte demonstriert werden, dass eine mögliche lokale Produktion von Östrogenen in endometriotischen Läsionen auf eine veränderte Expression von Östrogen-konvertierenden Enzymen zurückzuführen sein kann (Zeitoun et al. 1998; Zeitoun & Bulun 1999; Bergqvist & Theorell 2001). Die endometriotischen Implantate enthalten alle notwendigen regulatorischen Proteine, um E₂ de novo aus Cholesterol zu synthetisieren, ohne dabei auf androgene Vorgänger angewiesen zu sein. Insgesamt sind 6 Enzyme, die von mindestens 5 Genen gebildet werden, verantwortlich für die Synthesekette (Abb. 1.3). Während im gesunden uterinen Gewebe keine Östrogen-Biosynthese nachweisbar ist (Bulun et al. 1994; Bulun et al. 2004), kann die lokale Biosynthese von Östrogenen innerhalb von endometriotischen Läsionen auf die erhöhte Expression der Östrogen-konvertierenden Enzyme Aromatase und 17 β HSD-1 (Zeitoun et al. 1998; Zeitoun & Bulun 1999; Bergqvist & Theorell 2001) sowie eine verminderte Expression von 17 β HSD-2 (Zeitoun et al. 1998; Bulun et al. 1999; Bulun et al. 2000) zurückgeführt werden. Diese Enzyme wurden zunächst im eutopen Endometrium untersucht.

Transkripte des E₂ bildenden Enzyms 17 β HSD-1 konnten, wie auch von der Literatur her bekannt (Mustonen et al. 1998), in dem eutopen Endometrium nachgewiesen werden. In den Endometrien der Patientinnen mit Endometriose zeigte 17 β HSD-1 in der Proliferationsphase eine signifikant gesteigerte Expression, die zu einer gesteigerten E₂-Synthese führen könnte. Das Enzym 17 β HSD-2 war in der Proliferationsphase kaum, in der Sekretionsphase jedoch stark exprimiert. Die Hochregulation von 17 β HSD-2 ist P-abhängig und erfolgt über den PR (Kitawaki et al. 2000). Während Aromatase mRNA und Enzymaktivität in eutopem Endometrium von

Frauen mit Endometriose nachgewiesen werden konnte und in ektopen Läsionen hohe Level von Aromatase Genexpression und Enzymaktivität nachweisbar sind, konnte keine oder nur wenig Expression im eutopen Endometrium von gesunden Frauen nachgewiesen werden (Noble et al. 1996; Noble et al. 1997; Gurates et al. 2002; Bulun et al. 2005). Es ist zudem bekannt, dass Aromatase Transkripte und Protein in eutopen Endometrien von Patientinnen mit Adenomyose und/oder Leiomyose ausgebildet wird (Kitawaki et al. 1999).

Durch RT-PCR konnte die Expression der Aromatase im Rahmen dieser Arbeit in mehr als 95% der eutopen Endometrien von Frauen mit und in 80% der Fälle im Endometrium von Patientinnen ohne Endometriose nachgewiesen werden. Die Expression der Aromatase im eutopen Endometrium von Frauen ohne Endometriose lässt sich darauf zurückführen, dass in der Gruppe der Patientinnen ohne Endometriose auch Frauen mit Adenomyose oder Leiomyose enthalten waren und nur 24% der Frauen ohne Endometriose keine anderen diagnostizierten Erkrankungen des Reproduktionstraktes aufwiesen. In der Sekretionsphase waren die Aromatase-Transkripte bei den Patientinnen mit und ohne Endometriose etwas stärker exprimiert als in der Proliferationsphase. Dieses Phänomen wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Prof. S. Bulun, persönliche Mitteilung). Das Aromatase-Protein war in den Drüsenepithelien im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose, Adenomyose und Leiomyose lokalisiert. So gut wie keine Immunreaktion zeigte sich bei Endometrien von Frauen mit Kinderwunsch ohne weitere bekannte gynäkologische Erkrankungen. Dies geht mit den Ergebnissen der Literatur einher, wo das Aromatase-Protein immunhistochemisch im eutopen Endometrium im Zytoplasma von Drüsenzellen von Frauen mit Endometriose und Adenomyose nachgewiesen werden konnte, nicht aber bei gesunden Frauen oder Frauen mit cervikalem „carcinoma in situ“ (Kitawaki et al. 1999). Dass das eutope Endometrium eine Quelle von E_2 bei Endometriose darstellen kann, zeigte die Messung des Östrogen-Levels in peripherem und menstruellem Blut von Patientinnen mit Endometriose, Adenomyose und mit normalen menstruellen Zyklen. Es gab keine signifikanten Unterschiede im peripheren Blut, im menstruellem Blut jedoch traten die höchsten Level bei Frauen mit Adenomyose auf, gefolgt von Frauen mit Endometriose und Frauen mit regulärem Zyklus (Kitawaki et al. 1999). Aus diesem Grund wird die Untersuchung von endometrialen Biopsien auf Aromatase-Expression zur Diagnose von Endometriose diskutiert (Noble et al. 1996; Kitawaki et al. 1999). Da der immunhistochemische Nachweis der Aromatase

zeitaufwendig ist, untersuchten Dheenadayalu et al. (2002), ob der endometriale Nachweis von Aromatase durch RT-PCR als Marker für Endometriose, Adenomyose oder uterine Fibroide dienen kann. Dies könnte die Anzahl der laparoskopischen Untersuchungen reduzieren und eine Basis für medikamentöse Behandlung darstellen. In der Studie wurden jedoch 35% der Frauen ohne Erkrankung Aromatase-positiv getestet. Die Frage ist hierbei, ob diese Frauen wirklich krankheitsfrei waren oder möglicherweise über eine unentdeckte mikroskopische Endometriose verfügten. Hinzu kam, dass die Aromatase nicht in allen Endometrien von Frauen mit Endometriose (z.B. Stage II und III), Fibroiden oder Adenomyose exprimiert war. Ein Grund für diese Beobachtung kann die Möglichkeit sein, dass die Genexpression der Aromatase mit fortlaufender Erkrankung verschwindet oder aber, dass die Aromatase nicht generell mit Endometriose assoziiert ist (Zeitoun & Bulun 1999). Wolfler et al. (2005) untersuchten ebenfalls endometriale Biopsien vor Laparoskopien als mögliche Marker für Endometriose, jedoch in Verbindung mit Angaben aus den Patientinnenakten zu einer möglichen Dysmenorrhoe. Durch die Untersuchung mit Hilfe von Real-Time PCR und Immunhistochemie sowie dem klinischen Befund der mittleren bis schweren Dysmenorrhoe konnte bei 95,5% der für Aromatase-positiv getesteten Patientinnen bei der Laparoskopie eine Endometriose bestätigt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das vorliegende Ungleichgewicht der Expression von ER α , PR, 17 β HSD-1 und Aromatase in dem untersuchten Endometrium von Patientinnen mit Endometriose zu einer gesteigerten Östrogen-Sensitivität sowie E₂-Produktion führen könnte, die eine Rolle bei der Pathogenese der Endometriose als E₂-abhängige Erkrankung spielen kann. Die molekularen Mechanismen würden hierbei bereits im eutopen Endometrium zu finden sein und die Etablierung von ektopen Läsionen nach einer retrograden Menstruation unterstützen.

4.2 Expression von Steroidhormonrezeptoren und Enzymen des Steroidmetabolismus in humanem Endometrium kultiviert in der Nacktmaus

In der vorliegenden Arbeit wurde humanes Endometriumgewebe in die Peritonealhöhle von Nacktmäusen transplantiert, um die Regulation der Steroidhormonrezeptoren sowie der Steroid-metabolisierenden Enzyme unter medikamentöser Therapie zu untersuchen. In diesem von Grümmer et al. (2001) etablierten Nacktmausmodell für die Endometriose wurde zuvor gezeigt, dass die transplantierten endometrialen Fragmente ihre morphologischen Charakteristika und Differenzierungsparameter über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen beibehalten. Bevor der Einfluss von Pharmaka untersucht wurde, wurde zunächst die Expression der Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzyme in den humanen Endometriumfragmenten, die in Nacktmäusen kultiviert wurden, über einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen untersucht. Hierdurch sollte überprüft werden, wie lange sich die Expression dieser untersuchten Parameter unter diesen Bedingungen hält, und es sollte der geeignete Zeitraum für die Testung der Pharmaka bestimmt werden. Um einen möglichen Einfluss des Hormonstatus der Tiere auf die Stärke der Expression der Rezeptoren und Enzyme im humanem Endometrium zu analysieren, wurde das humane Gewebe in hormonbehandelten und unbehandelten zyklischen, sowie hormonsubstituierten OVX Mäusen transplantiert. Es zeigte sich unabhängig von der Hormonbehandlung der Nacktmäuse folgendes Ergebnis:

Nach der Transplantation der eutopen humanen endometrialen Fragmente in die Nacktmaus waren die Transkripte beider Steroidhormonrezeptoren, ER α und PR, sowie der Steroid-konvertierenden Enzyme in den kultivierten Fragmenten nachweisbar. Die Genexpression der Rezeptoren nahm zwar bei der Kultur der Endometrien in der Nacktmaus im Vergleich zum Ausgangsgewebe ab, blieb aber in den zyklischen Tieren mit und ohne Hormongabe bis 28 Tage Kulturdauer erhalten. Eine stärkere Abnahme der PR mRNA zeigte sich jediglich in den Endometrien, die in hormonsubstituierten OVX Mäusen kultiviert wurden. Grümmer et al. (2001) beobachteten in diesem Mausmodell für Endometriose, dass die Protein-Expression der Steroidhormonrezeptoren ER und PR in zyklischen, jedoch nicht in unbehandelten oder E₂-substituierten OVX Mäusen bis 28 Tagen Kulturdauer erhalten blieb. Die täglich verabreichte E₂-

Konzentration betrug dabei 0,2 µg pro Maus, war somit 4mal so hoch wie die in der vorliegenden Arbeit den hormonsubstituierten OVX Mäusen verabreichte Konzentration an E₂. Möglicherweise reicht diese Konzentration nicht aus, um die Genexpression des PR in den humanen Fragmenten aufrecht zu erhalten. Dies spiegelt sich auch in den geringen Uterusgewichten dieser Tiere wider. Da bekannt ist, dass in Kombination mit E₂ verabreichtes P die Induktion des PR durch E₂ verhindern kann (Prange-Kiel et al. 2001), ist es auch möglich, dass in der vorliegenden Arbeit das in Kombination mit E₂ verabreichte P die Expression des PR im kultivierten humanen Endometrium unterdrückt hat. Auch in den in Nacktmäusen kultivierten Endometrioseherden konnte die Expression von ERα und PR während des untersuchten Zeitraumes nachgewiesen werden. ERα zeigte jedoch nach 7 Tagen Kulturdauer im Vergleich zum untransplantierten Gewebe eine Abnahme der Expression. Von ER ist bekannt, dass das Verhältnis der beiden Isoformen ERα und ERβ in den eutopen und ektopen Endometrien unterschiedlich ist. Im Stroma und Drüsenepithel der eutopen Endometrien ist das mRNA Verhältnis von ERα zu ERβ in etwa 3mal so hoch wie in den endometriotischen Läsionen (Brandenberger et al. 1999; Fujimoto et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von ERβ in den kultivierten Läsionen nicht untersucht. Weiterführende Untersuchungen könnten klären, ob es nach Adhäsion und Angiogenese der transplantierten humanen Fragmente zu einer Reduktion der Genexpression von ERα und einer Steigerung von ERβ kommt, die für die beobachtete Abnahme von ERα verantwortlich sein könnte.

In Bezug auf die Enzyme des E₂-Metabolismus zeigte sich eine Abnahme der Expression von 17βHSD-1 und -2 in dem humanen Endometrium mit steigender Kulturdauer in der Maus, die an Tag 14 nach Implantation kaum noch nachzuweisen war. Dies kann möglicherweise an der von Grümmer et al. (2001) beobachteten Dedifferenzierung der kultivierten endometrialen Fragmente liegen, die nach 14 Tagen Kulturdauer eintritt und sich möglicherweise negativ auf die Transkription der im Drüsenepithel synthetisierten 17βHydroxysteroid Dehydrogenasen auswirkt. Nach Kultur in der Maus zeigte sich vor allem eine Expression von 17βHSD-1 in den Drüsenepithelien, die in unbehandelten zyklischen sowie in hormonsubstituierten OVX Tieren erhalten blieb. Trotz der relativ schnell abnehmenden mRNA-Expression in den kultivierten

Fragmenten ist das gebildete 17 β HSD-1 Protein offensichtlich über einen längeren Zeitraum so stabil, da es auch noch nach einer Kulturdauer von 28 Tagen in humanen Endometriumfragmenten nachweisbar war. Hierbei ist zu berücksichtigen dass kein funktioneller Protein-Assay erfolgt ist, so dass nicht sichergestellt ist, dass es sich um ein aktives Enzym handelt.

Obwohl für 17 β HSD-2 eine Hochregulation der Expression durch P beschrieben wurde (Kitawaki et al. 2000), zeigte sich keine höhere Expression in den in P-substituierten Nacktmäusen kultivierten Endometrien. Da die Induktion der Genexpression durch P über den PR erfolgt (Kitawaki et al. 2000), ist möglicherweise das Expressionslevel des PR in den kultivierten Fragmenten auf einem zu geringem Niveau, um zu einer gesteigerten 17 β HSD-2 Expression zu führen.

Das Enzym STS war in den in zyklischen Mäusen mit und ohne Hormongabe kultivierten Endometrien über den gesamten Versuchszeitraum gut erhalten. In Endometrien, die in hormonsubstituierten OVX Mäusen kultiviert wurden, nahm die Expression jedoch bereits ab Tag 3 nach Implantation signifikant ab, was mit dem Expressionsmuster des PR in den Endometrien, die in diesen Tieren kultiviert wurden, korreliert. In Studien zur Untersuchung von Brustkrebsgewebe zeigte sich ein inhibitorischer Effekt von E₂ auf die Expression von STS (Pasqualini & Chetrite 2005). Es könnte daher sein, dass die Expression der STS durch die E₂-Substitution inhibiert wurde. Dies würde ebenfalls die tendenzielle Abnahme der STS Expression ab Tag 14 nach Transplantation in den zyklischen, E₂-substituierten Mäusen erklären. Dagegen spricht jedoch, dass die zyklischen Mäuse mit einer höheren E₂-Menge substituiert wurden als die OVX Mäuse.

Die Expression der Aromatase Transkripte war in den humanen Endometrien aus unbehandelten zyklischen Mäusen auf einem sehr niedrigen Level, während sie in den Endometrien aus den hormonsubstituierten zyklischen und OVX Mäusen an Tag 3 und 7 nach Transplantation im Vergleich zum untransplantierten Ausgangsgewebe zunahm. Es ist bekannt, dass sich die Expression der Aromatase im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose nach retrograder Menstruation und peritonealer Implantation verstärkt (Noble et al. 1996; Noble et al. 1997). Die in dem hier beschriebenen Modell beobachtete Steigerung der Aromatase nach

Transplantation des humanen Gewebes in hormonsubstituierte Mäuse war jedoch nicht signifikant und beruhte auf einer geringen Versuchszahl von Gewebe von 2 bzw. 3 Patientinnen. Um definitive Aussagen über den Einfluss der Serumhormonkonzentration auf die Aromatase-Expression machen zu können, müssten daher größere Versuchsreihen durchgeführt werden. Dass der Serumhormonspiegel einen Einfluss auf die Aromatase-Expression haben kann, ist bekannt. So ist die Aromatase in der P-dominierten Sekretionsphase stärker exprimiert (Prof. S. Bulun, mündliche Mitteilung). Andererseits wurde eine Steigerung der Aromatase in endometriotischen Läsionen durch Prostaglandine beschrieben. Die PGE_2 Produktion bei Endometriose wird durch erhöhte Level an COX-2 verstärkt, das wiederum in endometrialen und endometriotischen Zellen durch E_2 , IL-1 β und PGE_2 stimuliert werden kann (Noble et al. 1997; Bulun et al. 2000).

Auf Proteinebene konnte in den in zyklischen und hormonsubstituierten OVX (nicht gezeigt) Nacktmäusen kultivierten Fragmenten an Tag 7 nach Transplantation eine Expression von Aromatase im Drüsenepithel nachgewiesen werden, die bis 28 Tage Kulturdauer erhalten blieb. Obwohl für die kultivierten Endometrien aus diesen Tieren nur eine geringe Genexpression der Aromatase zu verzeichnen war, ist diese Expression offensichtlich ausreichend, um das Enzym zu bilden.

Vergleicht man die Expression der Steroidhormonrezeptoren sowie Steroid-konvertierenden Enzyme im in Nacktmäusen kultiviertem humanem Endometrium von Patientinnen mit und ohne Endometriose, so zeigte sich vor allem innerhalb der ersten 7 Tage nach Transplantation tendenziell eine bessere Erhaltung von $\text{ER}\alpha$, der 17 β Hydroxysteroid Dehydrogenasen sowie STS bei den Patientinnen mit Endometriose. Dies kann möglicherweise auf eine erhöhte Steroidbiosynthese im Endometrium von Patientinnen mit Endometriose zurückzuführen sein.

In humanen Endometriose-Herden, die für 7 Tage in zyklischen Mäusen kultiviert wurden, zeigte sich eine Hochregulation von 17 β HSD-2, während für 17 β HSD-1 keine Änderung der Expression beobachtet werden konnte. Bei Frauen mit Endometriose wird 17 β HSD-1 im eutopen und ektopen Endometrium exprimiert, während 17 β HSD-2 mRNA und Protein nur im eutopen Endometrium in der Sekretionsphase nachgewiesen werden konnte und durch P induziert wird

(Zeitoun et al. 1998). Die in der Literatur beschriebene Resistenz gegenüber P in endometriotischen Läsionen basiert auf einer allgemeinen Reduktion des Levels an PR. Im normalen Endometrium wirkt P auf stromale Zellen, um die Sekretion von noch unbekannten parakrinen Faktoren zu induzieren. Diese Faktoren wirken auf benachbarte epitheliale Zellen und initiieren die Expression von 17 β HSD-2. In endometriotischen stromalen Zellen ist dieser Mechanismus behindert, was in einer fehlenden Stimulation von 17 β HSD-2 resultiert (Bulun et al. 2006). Die Frage ergibt sich, warum im Rahmen dieser Arbeit in den untersuchten humanen endometriotischen Läsionen eine deutliche Genexpression von 17 β HSD-2 nachweisbar war und diese sich nach 7 Tagen Kultur in der Maus steigerte. Dies könnte eine Ursache darin haben, dass die beobachtete Expression von PR in den humanen Fragmenten über eine Kulturdauer von 7 Tagen in der Maus erhalten bleibt. So könnte die Sensitivität der humanen Fragmente gegenüber P innerhalb dieses Zeitraumes weiterhin gewährleistet sein und eine Induktion von 17 β HSD-2 ermöglichen. Das Östron-synthetisierende Enzym STS war in den untransplantierten Herden im Vergleich zum eutopen Endometrium ungefähr gleich stark exprimiert und nahm in den Läsionen während der Kultur ab. Dies könnte durch den inhibitorischen Effekt von E₂ auf STS zu erklären sein, welches in den endometriotischen Läsionen verstärkt synthetisiert wird (Pasqualini & Chetrite 2005). Überraschend war die im Vergleich zum eutopen Endometrium gleiche Expression der Aromatase in den ektopen Läsionen sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene, die auch nach 7 Tagen Kulturdauer erhalten blieb. Der Literatur nach finden sich in endometriotischen Geweben erhöhte RNA-Mengen und Enzymaktivitäten der Aromatase, die durch PGE₂ induziert werden (Bulun et al. 2005). Möglicherweise fand in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Läsionen keine Stimulation der Transkriptmenge durch PGE₂ statt oder die Stimulation des Enzyms äußerte sich durch die Steigerung der Aktivität, die nicht untersucht wurde und somit nicht nachzuweisen war.

Bei der Kultur von humanem eutopen Endometrium in Nacktmäusen nahm vor allem die Expression der 17 β HSD-1 und -2 Transkripte mit Kulturdauer ab. Diese Abnahme erfolgte jedoch erst deutlich ab 7 Tage Kulturdauer, so dass es bis zu diesem Zeitpunkt möglich ist, Untersuchungen zur Expression dieser Enzyme durchzuführen. Da die Adhäsion von humanen

Endometrien, welche in immunsupprimierte Mäuse transplantiert wurden, bereits ab Tag 2 nach Transplantation und eine Neoangiogenese der Fragmente schon am 4 Kulturtag nachgewiesen werden kann (Grümmer et al. 2001), ist eine Versorgung der implantierten Läsionen mit verabreichten Substanzen gewährleistet. Somit wurde für die weiteren Untersuchungen zur Testung der Wirkung von Substanzen an transplantierten Endometrien ein Zeitpunkt von 5 Tagen festgesetzt. Da sich die generelle Tendenz bezüglich der Expression der Steroidhormonrezeptoren in den unterschiedlich behandelten Mäusen nicht gravierend unterschied, wurden die Endometrien in zyklischen Mäusen kultiviert.

4.3 Modulation der Transkription Östrogen-metabolisierender Enzyme in ektopen endometrialen Läsionen nach Substitution mit Pharmaka

In dem Mausmodell wurde untersucht, ob sich die Transkription Östrogen-metabolisierender Enzyme durch systemisch applizierte Pharmaka modulieren lässt. Zunächst wurde hier die Wirkung von bekannten, bereits in der Endometriose-Therapie eingesetzten Pharmaka untersucht. Anschließend wurden neu entwickelte Pharmaka unter besonderer Berücksichtigung der Hemmung von 17 β HSD-1 getestet.

4.3.1 Effekt von bekannten Pharmaka auf Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierende Enzyme in humanem Endometrium kultiviert in Nacktmäusen

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Expression E₂-metabolisierender Enzyme in ektopen endometrialen Läsionen durch systemisch applizierte Pharmaka reguliert werden kann. Der stärkste Effekt aller untersuchten Pharmaka zeigte sich auf die Hemmung der Aromatase. Die Transkription dieses Enzyms wurde durch die Substanzen Finrozol, Danazol, Dydrogesteron und MPA signifikant abgesenkt. Durch Finrozol wurde zusätzlich signifikant die Expression von 17 β HSD-1 reduziert, während Danazol und Dydrogesteron ferner signifikant die Anzahl der STS-Transkripte verminderten. Die Verabreichung von Cetrorelixacetat führte zu einer signifikanten Absenkung der Expression von ER α . Als Marker für eine eventuell

veränderte lokale E₂-Konzentration in den ektopen Läsionen wurde die Proliferation der Drüsenepithelien sowie die Expression von E₂-sensitiven Genen in den kultivierten Fragmenten untersucht.

Danazol

Danazol wurde in den Versuchen in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Im Hinblick auf die Wirkung auf den Mausorganismus senkte es nur in der geringeren Konzentration das Uterusgewicht der Nacktmäuse, während sich bei der höheren Konzentration eine Zunahme der Uterusgewichte zeigte. Diese Wirkung ist bereits aus früheren Studien bekannt, in denen Danazol bei Mäusen zu einer Vergrößerung der Uterushörner (Arya et al. 1976) führte. In einer weiteren Studie resultierte die 4-wöchige Behandlung mit 2-6 ng Danazol zu einer 5-7fachen Steigerung des Uterusgewichtes (Benghuzzi & England 1995). Berücksichtigt man die in dem untersuchten Mausmodell verwendete Konzentration von 2500 µg/d, die zu der Steigerung des Uterusgewichtes geführt hat, so scheint die schnelle Reaktion nach 5 Tagen auf die hohe Konzentration zurückzuführen zu sein. Dies wird durch die Plasmawerte der Mäuse unterstrichen, die bei dieser Konzentration erhöhte E₂-Serumwerte aufweisen.

Je nach der im Nacktmausmodell verwendeten Konzentration zeigte Danazol in der vorliegenden Arbeit auch unterschiedliche Wirkungen auf die Genregulation der untersuchten Steroidhormonrezeptoren sowie Steroid-konvertierenden Enzymen in den kultivierten humanen endometrialen Fragmenten. Aus Untersuchungen in humanen Leberzellen und Brustkrebstumor-Präparationen (Carlstrom et al. 1984) sowie von in vitro Studien in ektopen endometrialem Gewebe (Yamamoto et al. 1993) ist bekannt, dass Danazol als ein Inhibitor der STS Aktivität wirkt. Darüber hinaus kann die Expression von Aromatase mRNA und Protein im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose, Adenomyose und Leiomyose (Kitawaki et al. 1997) und die Aromatase-Aktivität im ektopen Endometrium (Yamamoto et al. 1993) durch Danazol reduziert werden, was zu einer Reduktion der lokalen E₂-Produktion aus Androgenen führen kann (Ishihara et al. 2003). Die bekannte Wirkung von Danazol als STS- und Aromatase-Inhibitor erfolgte in der geringeren Konzentration von 500 µg/d, durch die diese beiden Enzyme signifikant abgesenkt wurden. Diese Hemmung konnte hier jedoch nicht auf Proteinebene

bestätigt werden, was aber möglicherweise durch die relativ kurze Kulturdauer von 5 Tagen erklärt werden kann. Ein weiterer Grund hierfür könnte aber auch die ohnehin sehr schwache Aromatase-Proteinexpression im Endometrium, welches in unbehandelten Tieren kultiviert wurde, sein, so dass kein Unterschied zum Endometrium aus den mit Danazol behandelten Tieren zu erkennen war. Hier stellt sich die Frage, warum die Hemmung der Transkription von STS nicht durch Verabreichung der höheren Danazol-Konzentration erreicht werden konnte. Möglicherweise ist die hemmende Wirkung von Danazol auf die STS-Expression in dem kultivierten Endometrium dosisabhängig und zeigt sich ab einer gewissen Konzentration nicht mehr wirksam. Eine dosisabhängige Wirkung von Danazol auf die STS-Aktivität in Brustkrebszellen konnte in einer vorherigen Arbeit beschrieben werden (Nguyen et al. 1993). Eine andere Erklärung wäre, dass durch die Verwendung der höheren Danazol-Konzentration zwar die Aktivität des STS-Enzyms gehemmt wurde, diese Inhibierung auf Transkriptionsebene jedoch nicht erfolgt. In dem hier verwendeten Nacktmausmodell führte die Behandlung mit Danazol im transplantierten Endometrium zudem zu einer Reduktion der ER α -Transkription. Eine Reduktion der ER α mRNA durch Danazol konnte bereits in humanen Monozyten gezeigt werden (Fujimoto et al. 1995). In einer früheren Studie führte die einwöchige Behandlung mit Danazol im humanem eutopen Endometrium zu einer Reduktion der Proteinkonzentration von ER und PR (Kauppila et al. 1984). In der vorliegenden Arbeit kam es in den kultivierten Fragmenten zudem zu einer Steigerung der PR-Transkription. Dies korreliert mit Befunden, dass Danazol sowohl in Brustkrebszellen (Gledhill et al. 1992) als auch im Rattenuterus (Gledhill et al. 1992) zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration von PR führt. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Reduktion der Transkripte der E₂-synthetisierenden Enzyme STS und Aromatase durch die Behandlung mit Danazol beobachtet wurde, kam es unter Verwendung der gleichen Konzentration zu einer Steigerung der Proliferation der Drüsenepithelien. Ähnliches konnte in einer Studie beobachtet werden, in der die Ki67 und ER Immunfärbung des proliferativen Endometriums einer Patientin mit Endometriose nach der Behandlung mit Danazol wahrscheinlich aufgrund der zu gering verabreichten Konzentration positiv blieb (Ishihara et al. 2003). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Wirkung von Danazol auf die Proliferation kann somit entweder dosisabhängig sein oder aber der gewählte Behandlungszeitraum von 5

Tagen war für diese Substanz zu kurz, um einen anti-proliferativen Effekt auf die Drüsenepithelien des kultivierten Endometriums feststellen zu können.

Progestine

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, stellen die Progestine eine weitere Substanzgruppe für die Behandlung der Endometriose dar. Bruner et al. (1997) konnten im Nacktmausmodell demonstrieren, dass Endometrium, das mit P inkubiert wurde, nach Injektion in Nacktmäuse weniger endometriotische Läsionen bildete. Das Progestin Dydrogesteron (Duphaston®), das seit 1976 zur Behandlung von Endometriose eingesetzt wird (Johnston 1976), zeigt typische P-ähnliche Gestagenwirkungen ohne östrogene, androgene oder kortikoide Nebenwirkungen.

Dydrogesteron zeigte in dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mausmodell ebenso wie Danazol dosisabhängig eine unterschiedliche Wirkung. Als Progestin führt Duphaston® beim Menschen zu einer sekretorischen Transformation des Endometriums (FachInfo-Service, Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V., Aulendorf, Deutschland). Dies konnte auch in der Maus beobachtet werden, da die Behandlung mit Dydrogesteron (10 µg/d) eine Verschiebung des Zyklus der Mäuse zur P-dominierte Zyklusphase bewirkte. Auf das Uterusgewicht und die Plasmawerte der Tiere hatte Dydrogesteron nach 5-tägiger Anwendung keinen signifikanten Einfluss.

In den endometrialen Fragmenten senkte Dydrogesteron in der geringeren Konzentration signifikant die Genexpression der STS, während es tendenziell die Transkripte von 17βHSD-2 sowie der Steroidhormonrezeptoren steigerte, wohin gegen es in der höheren Konzentration zu einer Hemmung der Aromatase-Expression führte. Bei Brustkrebszellen zeigte sich Dydrogesteron als ein Inhibitor für die STS- und 17βHSD-1 Aktivität (Nguyen et al. 1993; Nguyen et al. 1995; Pasqualini et al. 1995). Somit konnte die Wirkung als STS Inhibitor bei der geringeren Konzentration von 10 µg/d hier auf Transkriptionsebene bestätigt werden. Bei beiden verwendeten Konzentrationen zeigte sich jedoch so gut wie kein Effekt auf die 17βHSD-1-Transkription. Hierbei ist zu beobachten, dass es sich bei den aus der Literatur bekannten Daten um die Regulationen der Enzym-Aktivität handelt, im hier verwendeten Nacktmausmodell aber

der Einfluss auf die Transkription untersucht wurde. Somit ist es nicht auszuschließen, dass hier ebenfalls die 17 β HSD-1 Aktivität gesenkt wurde, dies auf Transkriptionsebene aber nicht nachweisbar war. In der Konzentration von 50 μ g/d senkte Dydrogesteron die Proliferation der Drüsenepithelien der kultivierten endometrialen Fragmente. Cornillie et al. (1987) stellten fest, dass in ektopem Endometrium während der Behandlung mit Duphaston® keine Proliferation nachzuweisen war und demonstrierte so eine anti-proliferative Wirkung von Dydrogesteron, die durch die Untersuchungen im Mausmodell bestätigt wurden. Die festgestellten Wirkungen von Dydrogesteron auf den Steroidmetabolismus, die in einer reduzierten Produktion von E₂ resultieren könnten, wurden hier auch durch die stark reduzierte Genexpression des Gens Cyr61 bekräftigt. Cyr61 ist ein Östrogen-reguliertes Gen und wird in humanen Endometrium der E₂-dominierten Proliferationsphase verstärkt exprimiert. Ein hemmender Einfluss von Anti-Östrogenen auf die Cyr61 Expression konnte zuvor in einem Mausmodell gezeigt werden (Absenger et al. 2004). Überraschenderweise zeigte sich jedoch kein Einfluss auf die Expression der E₂-sensitiven Connexin Gene Cx26 und Cx43 in den humanen Fragmenten aus mit Dydrogesteron behandelten Mäusen. Es ist bekannt, dass im Rattenendometrium mRNA und Protein des im Stroma exprimierten Cx43 und des im Drüsen- und luminalen Epithel exprimierten Cx26 durch E₂ gesteigert werden (Grümmer et al. 1999). Im humanem Endometrium konnte eine starke Zunahme der Expression dieser Connexine in der Proliferationsphase beobachtet werden, wogegen diese Connexine in der Sekretionsphase nicht nachgewiesen werden konnten (Jahn et al. 1995; Grümmer et al. 1999). Die fehlende Inhibierung der Transkription dieser Connexine kann dadurch erklärt werden, dass in den transplantierten Fragmenten das Verhältnis von Drüsen zu Stroma sehr variabel war, was zu starken Schwankungen in der Genexpression von Cx26 und Cx43 führte, so dass diese Gene als Marker für eine gesteigerte E₂-Konzentration nicht geeignet scheinen.

MPA ist ein weiteres Progestin, das zur Behandlung von Endometriose eingesetzt wird (Telimaa et al. 1987). MPA bindet an den PR und bewirkt eine Verminderung der Bildung von Östrogenrezeptoren und eine Steigerung der Aktivität von 17 β HSD-2 (FachInfo-Service, Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V., Aulendorf, Deutschland). Diese Hemmung der Östrogenwirkung konnte auch im Mausorganismus gezeigt werden, da es zu einer Verschiebung zum Metöstrus, d.h. zur P-dominierten Zyklusphase, und zur Reduktion der

Uterusgewichte führte. Eine Reduktion des Uterusgewichtes, sowie der Drüsenepithelien durch MPA wurde zuvor bereits für die Maus beschrieben (Niwa et al. 1995).

In den humanen endometrialen Fragmenten, die in den Mäusen kultiviert wurden, senkte MPA signifikant die Genexpression der Aromatase und tendenziell die von 17 β HSD-1 und des PR. Dies könnte zu hypoöstrogenen Verhältnissen und einer geringeren Östrogen-Sensivität innerhalb der Läsionen führen. Hierfür spricht die reduzierte Proliferation in den kultivierten endometrialen Fragmenten. Anti-proliferative Effekte von MPA wurden bereits für endometriale Stromazellen *in vitro* (Surrey & Halme 1992) sowie für endometriale Karzinomzellen in einem Nacktmausmodell (Kato et al. 1991) beschrieben. Es kam in den kultivierten endometrialen Fragmenten jedoch nicht, wie bei Behandlung mit Dydrogesteron, zu einer Abnahme der Expression des E₂-sensitiven Cyr61. Es wurden in diesen Versuchen jedoch nur die Cyr61-Werte von zwei Patientinnen erfasst, wobei Cyr61 bei einer stark herunterreguliert und bei der zweiten hochreguliert wurde. Hier müsste der Einfluss von MPA auf die Regulation von Cyr61 in den ektopen Läsionen durch größere Fallzahlen statistisch abgesichert werden.

Das hier getestete Progestin Medrogeston (Prothil®) wird vor allem zur Ergänzung einer Östrogenbehandlung in den Wechseljahren sowie bei Regelstörungen aufgrund von Gestagenmangel eingesetzt (FachInfo-Service, Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V., Aulendorf, Deutschland). Es ist ein Gestagen mit den pharmakologischen Eigenschaften des P ohne androgene, östrogene, anabole oder kortikoide Eigenschaften, und führt ebenso wie Danazol, Dydrogesteron und MPA bei den Mäusen zu einer Reduktion des Uterusgewichtes. Bei der Behandlung von Brustkrebs führt es zur Stimulierung der Sulfotransferase (Pasqualini & Ebert 1999) und in Brustkrebszellen *in vitro* zur Inbibierung der Sulfatase (Pasqualini et al. 1998). In den in der Nacktmaus kultivierten humanen Endometriumfragmenten zeigte Medrogeston jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Genregulation der Steroidhormonrezeptoren bzw. Östrogen-konvertierenden Enzyme. Daher wurden an den Geweben aus mit Medrogeston behandelten Tieren keine weiteren Untersuchungen zur Proliferation bzw. Genexpression von Östrogen-sensitiven Genen durchgeführt.

Antiprogesterine

Von den bisher mehr als 400 verschiedenen synthetisierten Antiprogesterinen wurde bislang nur Mifepriston in der Behandlung der Endometriose eingesetzt. Die Behandlung führt zu einer Regression der Herde verbunden mit einer anovulatorischen Amenorrhoe ohne Hypoöstrogenismus (Kettel et al. 1996). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Antiprogesterine zu einer Reduktion von endometriotischen Läsionen im Tiermodell führen (Stoeckemann et al. 1995; Grow et al. 1996; Kettel & Hummel 1997).

In den kultivierten humanen Endometrium-Fragmenten zeigte sich nach Behandlung der Mäuse mit Mifepriston eine tendenzielle Steigerung der Genexpression von ER α und PR. Dies widerspricht Befunden, die einen inhibierenden Effekt von Mifepriston auf die Proteinexpression des PR im Endometrium in vivo (Narvekar et al. 2004) fanden und auf die Proteinexpression des ER- und PR in endometrialen und endometriotischen Zellen in vitro zeigten (Jiang et al. 2001). Die Therapie von Frauen in der Sekretionsphase führte auf Proteinebene zu einer Blockierung der Herunterregulation von ER und PR (Maentausta et al. 1993). Trotz dem in einigen Tier- und Human-Studien beobachteten antiproliferativen Effekt von Mifepriston (Cameron et al. 1996; Burleigh et al. 1998) gibt es auch Hinweise darauf, dass die Verabreichung von Mifepriston einen proliferativen Effekt auf das Endometrium haben kann (Newfield et al. 2001). Diese Reaktion ist abhängig von der Spezies, dem Gewebe, der Dosis und der Länge der Administration. Es konnte gezeigt werden, dass geringe Dosen zu einem anti-proliferativen Effekt im Endometrium von nicht-humanen Primaten und vom Menschen führen, hohe Dosen jedoch zu einer Hyperplasie (Chabbert-Buffet et al. 2005). Die in dem in den Nacktmäusen kultiviertem humanem Endometrium beobachtete Steigerung von ER α - und PR-Transkripten, die jedoch nicht signifikant war, deutet auf eine östrogene Wirkung hin. Möglicherweise könnte eine anti-östrogene Wirkung durch eine geringere Dosis erreicht werden. Auf die Genexpression der Steroid-konvertierenden Enzyme hatte die Behandlung mit Mifepriston keinen regulatorischen Einfluss.

Onapriston weist eine ähnliche Struktur wie Mifepriston auf und hemmt die Transaktivierung P-abhängiger Gene, die klinische Forschung mit diesem Antiprogesterin wurde jedoch aufgrund der Lebertoxizität eingestellt. In postmenopausalen Frauen kam es unter Behandlung mit Onapriston

zu keiner Hyperplasie des Endometriums, jedoch war dosisunabhängig immer eine Proliferation nachweisbar, was einen Unterschied zu Mifepriston darstellt (Cameron et al. 2003). In Bezug auf die Genexpression in den kultivierten humanen endometrialen Fragmenten zeigte Onapriston eine leichte Erhöhung der Transkription von 17 β HSD-1 und eine Inhibierung der von 17 β HSD-2, ER α sowie PR. Trotz der gleichen verabreichten Konzentration wie Mifepriston führt Onapriston somit zu der aus der Literatur bekannten Hemmung der Wirkung von Steroidhormonrezeptoren (McDonnell & Goldman 1994, Katkam et al. 1995, Parandoosh et al. 1995) und hat auch auf den Uterus der Mäuse eine stärkere anti-proliferative Wirkung als Mifepriston.

Cetrorelix

Die Entwicklung der LHRH-Antagonisten wurde bereits vor mehr als 20 Jahren erprobt (Hahn et al. 1985), diese waren jedoch zu lipophil und es traten als Nebenwirkungen Ödembildungen auf (Schmidt et al. 1984). Seitdem wurden viele Verbesserungen durch Aminosäuresubstitutionen durchgeführt (Bajusz et al. 1988), und kürzlich wurden GnRH-Antagonisten mit akzeptablem pharmakokinetischen Profil verfügbar (Fedele & Berlanda 2004), deren Wirkmechanismus auf einem kompetitiven Blocken von GnRH Rezeptoren basiert (Huirne & Lambalk 2001). Der Hauptvorteil gegenüber Agonisten ist, dass sie keine initiale Stimulation der Gonadotropin-Freisetzung bewirken. So veranlasst der im Rahmen der Arbeit untersuchte LHRH-Antagonist Cetrorelix (Cetrotide®) eine sofortige Inhibierung von LH und FSH (Reissmann et al. 2000) in vielen Spezies inklusive des Menschen (Szende et al. 1990; Behre et al. 1992; Weinbauer & Nieschlag 1993). Die Bindungsaffinität an Membranrezeptoren der Hypophyse ist ca. 20mal höher als für natives LHRH und 2mal höher als der Agonist Buserelin (Reissmann et al. 2000). Für die Therapie der Endometriose ist Cetrorelix interessant, da hier nach neuen Erkenntnissen eine totale Blockade der Östrogensynthese nicht nötig ist (Reissmann et al. 2000), und behandelte Endometriose-Patientinnen somit keine hypoöstrogenen Nebenwirkungen zeigten (Felberbaum et al. 2002). Eine 8-wöchige Behandlung resultierte in einer Regression der Herde in 60% der Fälle und in einer Verringerung des Ausmaßes der Erkrankung von Stage III auf Stage II (Kupker et al. 2002).

In der geringen Konzentration von 1 µg pro Tag hatte Cetorelix weder Einfluss auf den Zyklus noch auf das Uterusgewicht der behandelten Mäuse, während Behandlung der Mäuse mit 10 µg Cetorelix pro Tag zu einer Zyklusverschiebung zum E₂-dominierten Proöstrus und zu einer Steigerung des Uterusgewichtes der Tiere führte. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Behandlung von Nacktmäusen mit 45 µg Cetorelix zu einer Reduktion des Uterusgewichtes der Tiere nach 2 Wochen Behandlungsdauer führte (Yano et al. 1994). Möglicherweise ist die im Mausmodell angewandte Konzentration von 10 µg pro Tag im Vergleich zu den relativ hohen verwendeten Konzentrationen in der Literatur bei Nacktmäusen zu niedrig, um innerhalb von 5 Tagen ein hypo-östrogenes Milieu zu erzeugen.

Auch auf die Genexpression in den transplantierten humanen Endometrien zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung von Cetorelix. In der geringeren Konzentration steigerte es die Expression der 17βHydroxysteroid Dehydrogenasen und senkte die der Aromatase. In der höheren Konzentration zeigte sich eine signifikante Inhibierung der Transkription von ERα und eine leichte Hemmung der Östrogen-konvertierenden Enzyme außer der Aromatase. Es konnte kein Effekt auf die Proliferation in den humanen Fragmenten, jedoch eine Steigerung der Cyr61-Expression beobachtet werden. Eine Ursache für die gesteigerte Genexpression des Cyr61 könnte die leichte Steigerung der Aromatase sein. Da die Aromatase als Schlüsselenzym der Biosynthese über hohe Kapazitäten der Östrogen-Synthese verfügt, kann sich eine nur leicht gesteigerte Expression in einer verstärkten Synthese äußern.

Finrozol

In neuester Zeit haben sich Aromatasehemmer zur Behandlung der Endometriose als geeignet erwiesen (Amsterdam et al. 2005; Ebert et al. 2005). Diese Substanzen blockieren die Produktion extra-ovarieller Östrogene in der Haut, im Fettgewebe und in endometriotischen Läsionen, nicht aber die ovarielle Funktion (Bulun et al. 2005). Aromatasehemmer haben unterschiedliche Wirkweisen: Während steroidale Substanzen irreversibel an den Aromatase-Enzymkomplex binden, sind nicht-steroidale Substanzen wie z.B. Anastrozol, Letrozol und Finrozol reversible Enzym-Inhibitoren, die sich an den Hämkomplex anlagern (Ahokoski et al. 2001). Da beim Menschen Aromatase nur durch ein Gen kodiert wird, resultiert die Blockierung des Gens bzw. des Produktes effektiv in einer Inhibierung der Östrogen-Biosynthese (Attar & Bulun 2006).

Der im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendete Aromatasehemmer Finrozol führte zu einer deutlichen Reduktion des Uterusgewichtes der behandelten Mäuse. Dies geht mit Ergebnissen der Literatur einher, in denen ein anti-proliferativer Effekt von Aromatase-Inhibitoren auf murines eutopes Endometrium bereits beschrieben wurde (Yue et al. 1995; Fang et al. 2002).

In den kultivierten humanen endometrialen Fragmenten zeigte sich nach Behandlung mit Finrozol eine Herunterregulation der Genexpression der Steroidhormonrezeptoren ER α und PR sowie aller untersuchter Östrogen-konvertierender Enzyme, die für 17 β HSD-1 und Aromatase signifikant war. Das Hauptprodukt der Aromatase-Aktivität ist Östron, das durch 17 β HSD-1 in das biochemisch potentere E₂ umgewandelt wird. Die transkriptionelle Reduktion von 17 β HSD-1 und Aromatase sollte zu einer Reduktion der E₂-Synthese innerhalb der transplantierten Fragmente und so zu einer reduzierten Proliferation des Endometriums führen. Eine Rolle der Aromatase-Aktivität für das Wachstum von endometriotischen Implantaten konnte von Fang et al. (2002) demonstriert werden. Sie konnten zeigen, dass autotransplantiertes uterines Gewebe an das Peritoneum von Aromatase Knockout- oder Wildtyp-Mäusen nach Behandlung mit dem Aromatasehemmer Letrozol zu einer signifikanten Reduktion der Läsionengröße führte. Tatsächlich kommt es nach der Behandlung mit Finrozol zu einer signifikanten Senkung der Proliferation in den kultivierten Fragmenten sowie zu einer signifikanten Senkung der Expression des Östrogen-sensitiven Gens Cyr61.

Insgesamt kann Finrozol als die wirksamste im Mausmodell getestete Substanz beschrieben werden, durch die die Bildung von E₂ im humanen endometrialen Fragment gehemmt wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Genexpression der Steroid-konvertierenden Enzyme nach der Transplantation des Endometriums in die Nacktmäuse für mindestens 7 Tage erhalten bleibt. So konnte innerhalb dieses Zeitraumes die Wirkung systemisch applizierter bekannter Pharmaka auf die Expression der Enzyme in den ektopen humanen Endometriumfragmenten untersucht werden. Aufgrund der demonstrierten Regulation der Expression der E₂-metabolisierender Enzyme in den Läsionen durch die bekannten Pharmaka ist das verwendete Mausmodell somit geeignet, um neu entwickelte therapeutische Substanzen, die in den E₂-Metabolismus eingreifen, zu testen.

4.3.2 Einfluss von neu entwickelten 17 β HSD-1 Inhibitoren auf humanes Endometrium im Nacktmausmodell

Neben Aromatase wird auch 17 β HSD-1 als Zielenzym für neue Therapeutika zur Senkung der lokalen Östrogenkonzentration in Endometrioseherden diskutiert. Für Steroidhormone gibt es 17 β HSD Isoenzyme, die entweder als Reduktase oder Oxidase arbeiten und so als molekulare Schalter fungieren, die die Wirkung der Steroidhormone regulieren (Penning 2003). Da die 17 β HSD Enzyme eine gewebespezifische Ausbildung aufweisen, könnten 17 β HSD Inhibitoren lokal ihre Wirkung entfalten. Diese Inhibitoren werden als eine neue Klasse von Therapeutika, die „selective intracrine modulators“ (SIMs) diskutiert (Penning 2003). SIMs hätten dieselben gewebespezifischen Effekte wie selektive Steroidrezeptor-Modulatoren, würden jedoch Enzym- und nicht Rezeptor vermittelt wirken.

Von dem Solvay Pharmaceuticals Forschungslabor, Hannover, wurden 17 β HSD-1 Inhibitoren entwickelt (Husen et al. 2006), deren Wirkung in der vorliegenden Arbeit auf die Expression von Steroid-konvertierenden Enzymen in humanem Endometrium im Nacktmausmodell getestet wurde. 17 β HSD-1 ist ein Enzym, welches im Endometrium Östron zum biochemisch potenten E₂ umwandelt. Eine Vielzahl von Östrogen-abhängigen Erkrankungen konnten mit einer abweichenden 17 β HSD-1 Expression in Verbindung gebracht werden, wodurch 17 β HSD-1 als ein viel versprechendes therapeutisches Ziel zur Behandlung von Östrogen-sensitiven Pathologien wie z.B. Brust-, Ovar- und Endometriumkarzinom angesehen wird (Poirier 2003). Die hier verwendeten neu entwickelten 17 β HSD-1 Inhibitoren wurden zuvor in einem Tumormodell in der Maus getestet. Hier konnte gezeigt werden, dass sie das E₂-abhängige Wachstum von mit 17 β HSD-1 transfizierten MCF-7 Brustkarzinomzellen hemmen konnten (Husen et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit führte als einzige der getesteten Substanzen B10715942 zu einer signifikanten Hemmung der Transkription von 17 β HSD-1 in den humanen Läsionen. Gleichzeitig wurde hierdurch die Expression der Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzyme leicht inhibiert. Die Substanz B10719933 hingegen hemmte signifikant die 17 β HSD-2 Genexpression, was zu einer gesteigerten Konzentration von E₂ in den kultivierten

endometrialen Fragmenten führen könnte. Durch die Substanz B10720840 wurde die Menge der Transkripte von 17 β HSD-1 gesteigert und von STS reduziert. Da die entwickelten 17 β HSD-1 Inhibitoren auf Proteinebene wirken, ist es möglich, dass es sich bei der vorliegenden Steigerung der Genexpression von 17 β HSD-1 um einen Feedback-Mechanismus handelt. Im Hinblick auf eine Senkung der Aromatase-Genexpression konnte somit hier die Substanz B10715942 als geeignet evaluiert werden.

Bisher konnte im Maus-Uterus 17 β HSD-1 nur durch sensitive RT-PCR (Nokelainen et al. 1996), jedoch nicht durch in situ Hybridisierung (Pelletier et al. 2004) nachgewiesen werden, was annehmen lässt, dass das uterine Wachstum der Mäuse hauptsächlich von systemischen Östrogenen abhängig und weitgehend unabhängig von lokaler 17 β HSD-1 Expression ist. Dies konnte dadurch bestätigt werden, dass in dem Tumormodell in der Maus verabreichte 17 β HSD-1 Inhibitoren signifikant das Tumorwachstum der mit 17 β HSD-1 transfizierten MCF-7 Brustkarzinomzellen hemmen konnten, die gleiche Dosis jedoch keinen Einfluss auf das uterine Wachstum der Mäuse zeigte (Husen et al. 2006). Bisher ist jedoch noch unklar, ob dieser Effekt auf eine lokale Wirkung oder verminderte periphere Serum E₂-Level zurückzuführen ist.

Um eine Aussage über die lokale E₂-Konzentration in den in mit 17 β HSD-1 Inhibitoren behandelten Mäusen kultivierten Endometriumfragmenten treffen zu können, soll in anschließenden Versuchsreihen die Proliferation in diesen Fragmenten analysiert werden. Dies ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen. Bei den hier vorgestellten Ergebnissen handelt es sich um erste preliminäre Versuche. In weiterführenden Experimenten sollen diese neu entwickelten Inhibitoren an deutlich größeren Fallzahlen getestet werden.

4.4 Schlussfolgerungen

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich schließen, dass das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Mausmodell geeignet ist, um die Wirkung von systemisch applizierten Substanzen auf humanes, in den Nacktmäusen kultiviertes Endometrium zu untersuchen. Hierbei eignet sich das Modell besonders zur Untersuchung der Wirkungen auf die Transkription von

Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzymen sowie deren Wirkung auf die Proliferation.

Aufgrund der raschen Angiogenese der transplantierten Fragmente kann bereits ein Zeitpunkt von 5 Tagen Kulturdauer herangezogen werden, um Substanzwirkungen auf das humane Endometrium nachzuweisen. Untersuchungen innerhalb eines größeren Versuchszeitraumes würden jedoch gerade für die Analyse der Genexpression der Steroid-konvertierenden Enzyme eine längere Erhaltungszeit der Transkription erfordern. Mit Hilfe der Verwendung von immunsupprimierten Nacktmäusen wie z.B. SCID-Mäusen müsste dazu in folgenden Studien erprobt werden, ob durch die zusätzlichen Immundefekte der Tiere die Genexpression der untersuchten Enzyme in den transplantierten Endometrien tatsächlich länger aufrecht erhalten werden kann.

Als indirekter Marker für östrogene Effekte in den transplantierten Endometrien eignet sich vor allem die Analyse der Genexpression des E₂-sensitiven Gens Cyr61 sowie die Proliferation der Drüsenepithelien der kultivierten Fragmente. Da in den transplantierten Fragmenten das Verhältnis von Drüsen zu Stroma sehr variabel war, erwiesen sich Cx26 und Cx43 als Marker für eine gesteigerte E₂-Konzentration nicht geeignet.

Zur genaueren statistischen Analyse ist es unbedingt erforderlich, die Ergebnisse anhand von deutlich höheren Fallzahlen zu verifizieren.

4.5 Zusammenfassung

Als ein Faktor, der die Entstehung und Persistenz von Endometrioseherden beeinflussen kann, wird eine lokal erhöhte E₂-Konzentration in diesen Läsionen diskutiert. Als ein neuartiger therapeutischer Ansatz sollen Medikamente entwickelt werden, die in diese lokale E₂-Synthese eingreifen können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in humanem eutopen Endometrium, das in der Peritonealhöhle von Nacktmäusen kultiviert wurde, eine Genexpression der Steroidhormonrezeptoren ER α und PR sowie der Steroid-konvertierenden Enzyme 17 β HSD-1, -2, STS und Aromatase

nachgewiesen werden. Diese Genexpression aller Enzyme bleibt nach der Transplantation des Endometriums in die Nacktmäuse unabhängig von der hormonellen Behandlung der Tiere für mindestens 7 Tage erhalten. Somit erwies sich dieses Modell als geeignet, die Wirkung systemisch applizierter Pharmaka auf die Expression dieser Parameter in ektopen humanen Endometriumfragmenten zu untersuchen.

Als optimaler Zeitpunkt zur Testung der Wirkung von systemisch applizierten Substanzen wurde eine Behandlungsdauer von 5 Tagen festgesetzt. Durch die Verabreichung verschiedener bekannter Pharmaka, die bereits zur Behandlung der Endometriose eingesetzt werden, konnte die Transkription von Steroidhormonrezeptoren und Steroid-konvertierenden Enzymen in den endometrialen Fragmenten beeinflusst werden. Durch die Substanzen Danazol, Dydrogesteron, MPA und Finrozol konnte eine vermehrte Reduktion der Aromatase-Expression erzielt werden. Durch Finrozol wurde zudem die Expression von 17 β HSD-1, durch Danazol und Dydrogesteron zusätzlich die Transkription von STS gehemmt. Cetrorelixacetat reduzierte die Expression von ER α . Da eine proliferationshemmende Wirkung von Substanzen auf das Endometrium für die Prävention der Endometriose eine Rolle spielen kann, konnte als der am besten geeignete Marker für eine veränderte lokale Östrogenproduktion in den ektopen endometrialen Läsionen die Proliferation in den Drüsenepithelien der transplantierten humanen Fragmente ermittelt werden. Durch Finrozol konnte die Proliferation in den humanen Fragmenten signifikant gehemmt werden.

Von den von dem Solvay Pharmaceuticals Forschungslabor, Hannover, neu entwickelten 17 β HSD-1 Inhibitoren erwies sich die Substanz B10715942 am effektivsten im Hinblick auf eine signifikante Hemmung der Transkription von 17 β HSD-1. Diese Substanz zeigte sich ebenfalls effektiv in der Senkung der Aromatase-Genexpression.

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Transkription der verschiedenen untersuchten Enzyme des E₂-Metabolismus durch systemisch applizierte Substanzen reguliert werden kann.

5. Literatur

Absenger, Y., H. Hess-Stumpp, B. Kreft, J. Kratzschmar, B. Haendler, N. Schutze, P. A. Regidor & E. Winterhager (2004). "Cyr61, a deregulated gene in endometriosis." *Mol Hum Reprod* 10(6): 399-407.

Ahokoski, O., K. Irjala, M. Taalikka, P. Manninen, K. Halonen, L. Kangas, E. Salminen, R. Huupponen & H. Scheinin (2001). "Pharmacokinetics of finrozole (MPV-2213ad), a novel selective aromatase inhibitor, in healthy men." *Br J Clin Pharmacol* 52(6): 702-4.

Ailawadi, R. K., S. Jobanputra, M. Kataria, B. Gurates & S. E. Bulun (2004). "Treatment of endometriosis and chronic pelvic pain with letrozole and norethindrone acetate: a pilot study." *Fertil Steril* 81(2): 290-6.

Amsterdam, L. L., W. Gentry, S. Jobanputra, M. Wolf, S. D. Rubin & S. E. Bulun (2005). "Anastrozole and oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis." *Fertil Steril* 84(2): 300-4.

Andersson, M. C. (1993). "The pathogenesis of endometriosis." *Curr Obstet Gynaecol* 3: 122-127.

Aoki, D., Y. Katsuki, A. Shimizu, C. Kakinuma & S. Nozawa (1994). "Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice." *Obstet Gynecol* 83(2): 220-8.

Arya, M., N. K. Lohiya & V. S. Shivapuri (1976). "Observations on the effects of danazol on the female reproductive tract of mice." *Acta Eur Fertil* 7(3): 243-8.

Attar, E. & S. E. Bulun (2006). "Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects." *Hum Reprod Update* 12(1): 49-56.

Awwad, J. T., R. A. Sayegh, X. J. Tao, T. Hassan, S. T. Awwad & K. Isaacson (1999). "The SCID mouse: an experimental model for endometriosis." *Hum Reprod* 14(12): 3107-11.

Bajusz, S., M. Kovacs, M. Gazdag, L. Bokser, T. Karashima, V. J. Csernus, T. Janaky, J. Guoth & A. V. Schally (1988). "Highly potent antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone free of edematogenic effects." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(5): 1637-41.

Barile, G. & A. Bompiani (1977). "[Estrogen receptors in the impuberal rat uterus and their migration in isolated nuclei]." *Ann Ostet Ginecol Med Perinat* 98(3): 206-13.

Bayard, F., S. Damilano, P. Robel & E. E. Baulieu (1978). "Cytoplasmic and nuclear estradiol and progesterone receptors in human endometrium." *J Clin Endocrinol Metab* 46(4): 635-48.

- Behre, H. M., B. Klein, E. Steinmeyer, G. P. McGregor, K. Voigt & E. Nieschlag** (1992). "Effective suppression of luteinizing hormone and testosterone by single doses of the new gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix (SB-75) in normal men." *J Clin Endocrinol Metab* 75(2): 393-8.
- Beliard, A., A. Noel, F. Goffin, F. Frankenne & J. M. Foidart** (2002). "Role of endocrine status and cell type in adhesion of human endometrial cells to the peritoneum in nude mice." *Fertil Steril* 78(5): 973-8.
- Benghuzzi, H. A. & B. G. England** (1995). "The effect of sustained delivery of danazol and antioxidants on lipoprotein profiles of adult female mice." *Biomed Sci Instrum* 31: 171-6.
- Bergqvist, A., S. Jeppsson, S. Kullander & O. Ljungberg** (1985). "Human uterine endometrium and endometriotic tissue transplanted into nude mice. Morphologic effects of various steroid hormones." *Am J Pathol* 121(2): 337-41.
- Bergqvist, A. & T. Theorell** (2001). "Changes in quality of life after hormonal treatment of endometriosis." *Acta Obstet Gynecol Scand* 80(7): 628-37.
- Berkley, K. J., A. J. Rapkin & R. E. Papka** (2005). "The pains of endometriosis." *Science* 308(5728): 1587-9.
- Brandenberger, A. W., D. I. Lebovic, M. K. Tee, I. P. Ryan, J. F. Tseng, R. B. Jaffe & R. N. Taylor** (1999). "Oestrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells." *Mol Hum Reprod* 5(7): 651-5.
- Bruner, K. L., E. Eisenberg, F. Gorstein & K. G. Osteen** (1999). "Progesterone and transforming growth factor-beta coordinately regulate suppression of endometrial matrix metalloproteinases in a model of experimental endometriosis." *Steroids* 64(9): 648-53.
- Bruner, K. L., L. M. Matrisian, W. H. Rodgers, F. Gorstein & K. G. Osteen** (1997). "Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice." *J Clin Invest* 99(12): 2851-7.
- Bruner-Tran, K. L., D. Webster-Clair & K. G. Osteen** (2002). "Experimental endometriosis: the nude mouse as a xenographic host." *Ann N Y Acad Sci* 955: 328-39; discussion 340-2, 396-406.
- Bulun, S. E., Y. H. Cheng, P. Yin, G. Imir, H. Utsunomiya, E. Attar, J. Innes & J. Julie Kim** (2006). "Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol." *Mol Cell Endocrinol* 248(1-2): 94-103.
- Bulun, S. E., Z. Fang, G. Imir, B. Gurates, M. Tamura, B. Yilmaz, D. Langoi, S. Amin, S. Yang & S. Deb** (2004). "Aromatase and endometriosis." *Semin Reprod Med* 22(1): 45-50.

- Bulun, S. E., G. Imir, H. Utsunomiya, S. Thung, B. Gurates, M. Tamura & Z. Lin** (2005). "Aromatase in endometriosis and uterine leiomyomata." *J Steroid Biochem Mol Biol* 95(1-5): 57-62.
- Bulun, S. E., Z. Lin, G. Imir, S. Amin, M. Demura, B. Yilmaz, R. Martin, H. Utsunomiya, S. Thung, B. Gurates, M. Tamura, D. Langoi & S. Deb** (2005). "Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment." *Pharmacol Rev* 57(3): 359-83.
- Bulun, S. E., M. S. Mahendroo & E. R. Simpson** (1993). "Polymerase chain reaction amplification fails to detect aromatase cytochrome P450 transcripts in normal human endometrium or decidua." *J Clin Endocrinol Metab* 76(6): 1458-63.
- Bulun, S. E., E. R. Simpson & R. A. Word** (1994). "Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human uterine leiomyoma tissues and cells in culture." *J Clin Endocrinol Metab* 78(3): 736-43.
- Bulun, S. E., K. Zeitoun, K. Takayama, L. Noble, D. Michael, E. Simpson, A. Johns, M. Putman & H. Sasano** (1999). "Estrogen production in endometriosis and use of aromatase inhibitors to treat endometriosis." *Endocr Relat Cancer* 6(2): 293-301.
- Bulun, S. E., K. M. Zeitoun, K. Takayama & H. Sasano** (2000). "Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance." *J Mol Endocrinol* 25(1): 35-42.
- Burleigh, D. W., R. F. Williams, K. Gordon, J. G. Hsiu & G. D. Hodgen** (1998). "Screening for antiproliferative actions of mifepristone. Differential endometrial responses of primates versus rats." *Contraception* 58(1): 45-50.
- Busacca, M. & M. Vignali** (2003). "Ovarian endometriosis: from pathogenesis to surgical treatment." *Curr Opin Obstet Gynecol* 15(4): 321-6.
- Cameron, S. T., H. O. Critchley, K. J. Thong, C. H. Buckley, A. R. Williams & D. T. Baird** (1996). "Effects of daily low dose mifepristone on endometrial maturation and proliferation." *Hum Reprod* 11(11): 2518-26.
- Cameron, S. T., A. F. Glasier, N. Narvekar, A. Gebbie, H. O. Critchley & D. T. Baird** (2003). "Effects of onapristone on postmenopausal endometrium." *Steroids* 68(10-13): 1053-9.
- Carlstrom, K., A. Doberl, A. Pousette, G. Rannevik & N. Wilking** (1984). "Inhibition of steroid sulfatase activity by danazol." *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 123: 107-11.
- Casey, M. L., P. C. MacDonald & S. Andersson** (1994). "17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progestin regulation of gene expression in human endometrium." *J Clin Invest* 94(5): 2135-41.

Chabbert-Buffet, N., G. Meduri, P. Bouchard & I. M. Spitz (2005). "Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications." *Hum Reprod Update* 11(3): 293-307.

Chen, G. T., C. T. Tai, L. S. Yeh, T. C. Yang & H. D. Tsai (2002). "Identification of the cadherin subtypes present in the human peritoneum and endometriotic lesions: potential role for P-cadherin in the development of endometriosis." *Mol Reprod Dev* 62(3): 289-94.

Chwalisz, K., M. C. Perez, D. Demanno, C. Winkel, G. Schubert & W. Elger (2005). "Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis." *Endocr Rev* 26(3): 423-38.

Cornillie, F. J., P. Puttemans & I. A. Brosens (1987). "Histology and ultrastructure of human endometriotic tissues treated with dydrogesterone (Duphaston)." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 26(1): 39-55.

Dheenadayalu, K., I. Mak, S. Gordts, R. Campo, J. Higham, P. Puttemans, J. White, M. Christian, L. Fusi & J. Brosens (2002). "Aromatase P450 messenger RNA expression in eutopic endometrium is not a specific marker for pelvic endometriosis." *Fertil Steril* 78(4): 825-9.

D'Hooghe, T. M., C. S. Bambra, B. M. Raeymaekers & P. R. Koninckx (1996). "Increased prevalence and recurrence of retrograde menstruation in baboons with spontaneous endometriosis." *Hum Reprod* 11(9): 2022-5.

Donnez, J., M. Nisolle & F. Casanas-Roux (1992). "Three-dimensional architectures of peritoneal endometriosis." *Fertil Steril* 57(5): 980-3.

Donnez, J., A. Van Langendonckt, F. Casanas-Roux, J. P. Van Gossum, C. Pirard, P. Jadoul, J. Squifflet & M. Smets (2002). "Current thinking on the pathogenesis of endometriosis." *Gynecol Obstet Invest* 54 Suppl 1: 52-8; discussion 59-62.

Donnez, J., M. Wayembergh, F. Casanas-Roux, Y. Karaman, T. Willems & J. Ferin (1987). "Effect on ovulation of surgically induced endometriosis in rabbits." *Gynecol Obstet Invest* 24(2): 131-7.

Ebert, A. D., J. Bartley & M. David (2005). "Aromatase inhibitors and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in endometriosis: new questions--old answers?" *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 122(2): 144-50.

Evans, A., B. Vollenhoven & D. Healy (1999). "Modern antioestrogens and the coming revolution in women's health care." *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 39(3): 334-40.

- Fang, Z., S. Yang, B. Gurates, M. Tamura, E. Simpson, D. Evans & S. E. Bulun** (2002). "Genetic or enzymatic disruption of aromatase inhibits the growth of ectopic uterine tissue." *J Clin Endocrinol Metab* 87(7): 3460-6.
- Fanton, J. W. & G. B. Hubbard** (1983). "Spontaneous endometriosis in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)." *Lab Anim Sci* 33(6): 597-9.
- Fedele, L. & N. Berlanda** (2004). "Emerging drugs for endometriosis." *Expert Opin Emerg Drugs* 9(1): 167-77.
- Felberbaum, R. & K. Diedrich** (1999). "Ovarian stimulation for in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection with gonadotrophins and gonadotrophin-releasing hormone analogues: agonists and antagonists." *Hum Reprod* 14 Suppl 1: 207-21.
- Felberbaum, R. E., W. Kupker & K. Diedrich** (2002). "Will GnRH antagonists assist in the treatment of benign gynaecological diseases?" *Reprod Biomed Online* 5 Suppl 1(3): 68-72.
- Fournet-Dulguerov, N., N. J. MacLusky, C. Z. Leranth, R. Todd, C. R. Mendelson, E. R. Simpson & F. Naftolin** (1987). "Immunohistochemical localization of aromatase cytochrome P-450 and estradiol dehydrogenase in the syncytiotrophoblast of the human placenta." *J Clin Endocrinol Metab* 65(4): 757-64.
- Fujimoto, J., R. Hirose, H. Sakaguchi & T. Tamaya** (1999). "Expression of oestrogen receptor-alpha and -beta in ovarian endometriomata." *Mol Hum Reprod* 5(8): 742-7.
- Fujimoto, J., M. Hori, T. Itoh, S. Ichigo, M. Nishigaki & T. Tamaya** (1995). "Danazol decreases transcription of estrogen receptor gene in human monocytes." *Gen Pharmacol* 26(3): 507-16.
- Fukaya, T., J. Sugawara, H. Yoshida, T. Murakami & A. Yajima** (1999). "Intercellular adhesion molecule-1 and hepatocyte growth factor in human endometriosis: original investigation and a review of literature." *Gynecol Obstet Invest* 47 Suppl 1: 11-6; discussion 16-7.
- Garcia-Velasco, J. A. & A. Arici** (1999). "Is the endometrium or oocyte/embryo affected in endometriosis?" *Hum Reprod* 14 Suppl 2: 77-89.
- Garrido, N., J. Navarro, J. Garcia-Velasco, J. Remoh, A. Pellice & C. Simon** (2002). "The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility." *Hum Reprod Update* 8(1): 95-103.
- Gledhill, J. M., S. Barker, C. Wanless, J. P. Hinson, J. R. Puddefoot, C. Panahy, A. W. Goode & G. P. Vinson** (1992). "Progesterone receptor induction by danazol in cultured cancer cells and the rat uterus." *J Steroid Biochem Mol Biol* 43(4): 289-96.
- Gleicher, N.** (1992). "Endometriosis: a new approach is needed." *Hum Reprod* 7(6): 821-4.

- Gonzalez-Barcena, D., R. B. Alvarez, E. P. Ochoa, I. C. Cornejo, A. M. Comaru-Schally, A. V. Schally, J. Engel, T. Reissmann & H. Riethmuller-Winzen** (1997). "Treatment of uterine leiomyomas with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix." *Hum Reprod* 12(9): 2028-35.
- Goss, P. E. & K. Strasser** (2001). "Aromatase inhibitors in the treatment and prevention of breast cancer." *J Clin Oncol* 19(3): 881-94.
- Greenblatt, R. B., W. P. Dmowski, V. B. Mahesh & H. F. Scholer** (1971). "Clinical studies with an antigonadotropin-Danazol." *Fertil Steril* 22(2): 102-12.
- Grow, D. R., R. F. Williams, J. G. Hsiu & G. D. Hodgen** (1996). "Antiprogesterin and/or gonadotropin-releasing hormone agonist for endometriosis treatment and bone maintenance: a 1-year primate study." *J Clin Endocrinol Metab* 81(5): 1933-9.
- Grümmer, R., F. Schwarzer, K. Bainczyk, H. Hess-Stumpp, P. A. Regidor, A. E. Schindler & E. Winterhager** (2001). "Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model." *Hum Reprod* 16(8): 1736-43.
- Grümmer, R., O. Traub & E. Winterhager** (1999). "Gap junction connexin genes cx26 and cx43 are differentially regulated by ovarian steroid hormones in rat endometrium." *Endocrinology* 140(6): 2509-16.
- Gurates, B., S. Sebastian, S. Yang, J. Zhou, M. Tamura, Z. Fang, T. Suzuki, H. Sasano & S. E. Bulun** (2002). "WT1 and DAX-1 inhibit aromatase P450 expression in human endometrial and endometriotic stromal cells." *J Clin Endocrinol Metab* 87(9): 4369-77.
- Hahn, D. W., J. L. McGuire, W. W. Vale & J. Rivier** (1985). "Reproductive/endocrine and anaphylactoid properties of an LHRH-antagonist, ORF 18260 [Ac-DNAL1(2), 4FDPhe2,D-Trp3,D-Arg6]-GnRH." *Life Sci* 37(6): 505-14.
- Halban, J.** (1924). "Metastatic hysteroadenosis." *Wien Klin Wochenschr* 37: 1205-1206.
- Halme, J., M. G. Hammond, J. F. Hulka, S. G. Raj & L. M. Talbert** (1984). "Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis." *Obstet Gynecol* 64(2): 151-4.
- Han, S. & N. Sidell** (2003). "RU486-induced growth inhibition of human endometrial cells involves the nuclear factor-kappa B signaling pathway." *J Clin Endocrinol Metab* 88(2): 713-9.
- Haney, A. F. & J. B. Weinberg** (1988). "Reduction of the intraperitoneal inflammation associated with endometriosis by treatment with medroxyprogesterone acetate." *Am J Obstet Gynecol* 159(2): 450-4.

Hart, R. (2003). "Unexplained infertility, endometriosis, and fibroids." *Bmj* 327(7417): 721-4.

Huang, J., Y. F. Shi & C. Y. Zhou (2005). "[Expressions of aromatase P450 and estrogen receptor in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and their correlation with endometriosis]." *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 40(3): 171-4.

Huber, J. (1998). Das endokrine System. *Endokrine Gynäkologie*. J. Huber. Wien, München, Berlin, Wilhelm Maudrich: 5-93.

Hucke, J. & W. Distler (1989). "[Clinical manifestation and classification of endometriosis]." *Gynakologe* 22(5): 289-93.

Huirne, J. A. & C. B. Lambalk (2001). "Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists." *Lancet* 358(9295): 1793-803.

Hull, M. L., D. S. Charnock-Jones, C. L. Chan, K. L. Bruner-Tran, K. G. Osteen, B. D. Tom, T. P. Fan & S. K. Smith (2003). "Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis." *J Clin Endocrinol Metab* 88(6): 2889-99.

Husen, B., K. Huhtinen, M. Poutanen, L. Kangas, J. Messinger & H. Thole (2006). "Evaluation of inhibitors for 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in vivo in immunodeficient mice inoculated with MCF-7 cells stably expressing the recombinant human enzyme." *Mol Cell Endocrinol*.

Ishihara, H., J. Kitawaki, N. Kado, H. Koshiba, S. Fushiki & H. Honjo (2003). "Gonadotropin-releasing hormone agonist and danazol normalize aromatase cytochrome P450 expression in eutopic endometrium from women with endometriosis, adenomyosis, or leiomyomas." *Fertil Steril* 79 Suppl 1: 735-42.

Jahn, E., I. Classen-Linke, M. Kusche, H. M. Beier, O. Traub, R. Grümmer & E. Winterhager (1995). "Expression of gap junction connexins in the human endometrium throughout the menstrual cycle." *Hum Reprod* 10(10): 2666-70.

Jiang, J., R. Wu & Z. Wang (2001). "[Effects of mifepristone on expression of estrogen receptor and progesterone receptor in cultured human eutopic and ectopic endometria]." *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 36(4): 218-21.

Johnston, W. I. (1976). "Dydrogesterone and endometriosis." *Br J Obstet Gynaecol* 83(1): 77-80.

Katkam, R. R., K. Gopalkrishnan, K. Chwalisz, E. Schillinger & C. P. Puri (1995). "Onapristone (ZK 98.299): a potential antiprogesterin for endometrial contraception." *Am J Obstet Gynecol* 173(3): 779-87.

Kato, Y., T. Morisawa & H. Kuramoto (1991). "[Growth regulation of sex steroid hormone in endometrial carcinoma transplanted into nude mice]." *Hum Cell* 4(2): 165-70.

Kaupila, A., P. Vierikko, H. Isotalo, L. Ronnberg & R. Vihko (1984). "Cytosol estrogen and progesterone receptor concentrations and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in the endometrium and endometriotic tissue. Effects of hormonal treatment." *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 123: 45-9.

Kettel, L. M. & W. P. Hummel (1997). "Modern medical management of endometriosis." *Obstet Gynecol Clin North Am* 24(2): 361-73.

Kettel, L. M., A. A. Murphy, A. J. Morales, A. Ulmann, E. E. Baulieu & S. S. Yen (1996). "Treatment of endometriosis with the antiprogestone mifepristone (RU486)." *Fertil Steril* 65(1): 23-8.

Kitawaki, J., H. Koshiba, H. Ishihara, I. Kusuki, K. Tsukamoto & H. Honjo (2000). "Progesterone induction of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 during the secretory phase occurs in the endometrium of estrogen-dependent benign diseases but not in normal endometrium." *J Clin Endocrinol Metab* 85(9): 3292-6.

Kitawaki, J., I. Kusuki, H. Koshiba, K. Tsukamoto, S. Fushiki & H. Honjo (1999). "Detection of aromatase cytochrome P-450 in endometrial biopsy specimens as a diagnostic test for endometriosis." *Fertil Steril* 72(6): 1100-6.

Kitawaki, J., T. Noguchi, T. Amatsu, K. Maeda, K. Tsukamoto, T. Yamamoto, S. Fushiki, Y. Osawa & H. Honjo (1997). "Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium." *Biol Reprod* 57(3): 514-9.

Kokorine, I., M. Nisolle, J. Donnez, Y. Eeckhout, P. J. Courtoy & E. Marbaix (1997). "Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions." *Fertil Steril* 68(2): 246-51.

Küpker, W. (2002). "Medikamentöse Therapie der Endometriose mit GnRH-Antagonisten." *Gynäkologe* 35: 243-9.

Kupker, W., R. E. Felberbaum, M. Krapp, T. Schill, E. Malik & K. Diedrich (2002). "Use of GnRH antagonists in the treatment of endometriosis." *Reprod Biomed Online* 5(1): 12-6.

Labrie, F., V. Luu-The, C. Labrie, D. Berube, J. Couet, H. F. Zhao, R. Gagne & J. Simard (1989). "Characterization of two mRNA species encoding human estradiol 17 beta-dehydrogenase and assignment of the gene to chromosome 17." *J Steroid Biochem* 34(1-6): 189-97.

Lamb, J. C. t., R. R. Newbold, W. E. Stumpf & J. A. McLachlan (1978). "Transitional changes in the surface epithelium of the cycling mouse vagina, cervix and uterus: scanning electron microscopic studies." *Biol Reprod* 19(4): 701-11.

Ledger, W. L. (1999). "Endometriosis and infertility: an integrated approach." *Int J Gynaecol Obstet* 64 Suppl 1: S33-40.

Leidenberger, F. L., T. Strowitzki & O. Ortmann (2004). Endometriose. Klinische Endokrinologie für Frauenärzte. F. L. Leidenberger. Heidelberg, Springer: 509-526.

Lessey, B. A. & S. L. Young (1997). "Integrins and other cell adhesion molecules in endometrium and endometriosis." *Semin Reprod Endocrinol* 15(3): 291-9.

Li, D. K., L. Liu & R. Odouli (2003). "Exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and risk of miscarriage: population based cohort study." *Bmj* 327(7411): 368.

Li, Y., V. Isomaa, A. Pulkka, R. Herva, H. Peltoketo & P. Vihko (2005). "Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, P450 aromatase, and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, 5 and 7 mRNAs in human early and mid-gestation placentas." *Placenta* 26(5): 387-92.

Liu, D. T. & A. Hitchcock (1986). "Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology." *Br J Obstet Gynaecol* 93(8): 859-62.

MacKenzie, W. F. & H. W. Casey (1975). "Animal model of human disease. Endometriosis. Animal model: endometriosis in rhesus monkeys." *Am J Pathol* 80(2): 341-4.

Maentausta, O., P. Svalander, K. G. Danielsson, M. Bygdeman & R. Vihko (1993). "The effects of an antiprogesterone, mifepristone, and an antiestrogen, tamoxifen, on endometrial 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and progesterone and estrogen receptors during the luteal phase of the menstrual cycle: an immunohistochemical study." *J Clin Endocrinol Metab* 77(4): 913-8.

Makhmudova, G. M., D. K. Nazhmudinova, D. Gafarova & D. Lukmanova Iu (2003). "[Efficacy of duphaston treatment in women with endometriosis after reconstructive surgery]." *Akush Ginekol (Sofiia)* 42(4): 42-6.

Matsuura-Sawada, R., T. Murakami, Y. Ozawa, H. Nabeshima, J. Akahira, Y. Sato, Y. Koyanagi, M. Ito, Y. Terada & K. Okamura (2005). "Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue in immunodeficient mice." *Hum Reprod* 20(6): 1477-84.

McDonnell, D. P. & M. E. Goldman (1994). "RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism." *J Biol Chem* 269(16): 11945-9.

- Mesiano, S., E. C. Chan, J. T. Fitter, K. Kwek, G. Yeo & R. Smith** (2002). "Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium." *J Clin Endocrinol Metab* 87(6): 2924-30.
- Mindnich, R., G. Moller & J. Adamski** (2004). "The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases." *Mol Cell Endocrinol* 218(1-2): 7-20.
- Mitchell, D. C. & N. H. Ing** (2003). "Estradiol stabilizes estrogen receptor messenger ribonucleic acid in sheep endometrium via discrete sequence elements in its 3'-untranslated region." *Mol Endocrinol* 17(4): 562-74.
- Mustonen, M. V., V. V. Isomaa, T. Vaskivuo, J. Tapanainen, M. H. Poutanen, F. Stenback, R. K. Vihko & P. T. Vihko** (1998). "Human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 messenger ribonucleic acid expression and localization in term placenta and in endometrium during the menstrual cycle." *J Clin Endocrinol Metab* 83(4): 1319-24.
- Narvekar, N., S. Cameron, H. O. Critchley, S. Lin, L. Cheng & D. T. Baird** (2004). "Low-dose mifepristone inhibits endometrial proliferation and up-regulates androgen receptor." *J Clin Endocrinol Metab* 89(5): 2491-7.
- Newfield, R. S., I. M. Spitz, C. Isacson & M. I. New** (2001). "Long-term mifepristone (RU486) therapy resulting in massive benign endometrial hyperplasia." *Clin Endocrinol (Oxf)* 54(3): 399-404.
- Nguyen, B. L., G. Chetrite & J. R. Pasqualini** (1995). "Transformation of estrone and estradiol in hormone-dependent and hormone-independent human breast cancer cells. Effects of the antiestrogen ICI 164,384, danazol, and promegestone (R-5020)." *Breast Cancer Res Treat* 34(2): 139-46.
- Nguyen, B. L., I. Ferme, G. Chetrite & J. R. Pasqualini** (1993). "Action of danazol on the conversion of estrone sulfate to estradiol and on the sulfatase activity in the MCF-7, T-47D and MDA-MB-231 human mammary cancer cells." *J Steroid Biochem Mol Biol* 46(1): 17-23.
- Nisolle, M., F. Casanas-Roux, V. Anaf, J. M. Mine & J. Donnez** (1993). "Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis." *Fertil Steril* 59(3): 681-4.
- Nisolle, M., F. Casanas-Roux, E. Marbaix, P. Jadoul & J. Donnez** (2000). "Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice." *Hum Reprod* 15(3): 572-7.
- Nisolle, M. & J. Donnez** (1997). "Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities." *Fertil Steril* 68(4): 585-96.

- Niwa, K., S. Morishita, T. Murase, N. Itoh, T. Tanaka, H. Mori & T. Tamaya (1995). "Inhibitory effects of medroxyprogesterone acetate on mouse endometrial carcinogenesis." *Jpn J Cancer Res* 86(8): 724-9.
- Noble, L. S., E. R. Simpson, A. Johns & S. E. Bulun (1996). "Aromatase expression in endometriosis." *J Clin Endocrinol Metab* 81(1): 174-9.
- Noble, L. S., K. Takayama, K. M. Zeitoun, J. M. Putman, D. A. Johns, M. M. Hinshelwood, V. R. Agarwal, Y. Zhao, B. R. Carr & S. E. Bulun (1997). "Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells." *J Clin Endocrinol Metab* 82(2): 600-6.
- Noci, I., P. Borri, O. Chieffi, G. Scarselli, R. Biagiotti, D. Moncini, M. Paglierani & G. Taddei (1995). "I. Aging of the human endometrium: a basic morphological and immunohistochemical study." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 63(2): 181-5.
- Noe, M., G. Kunz, M. Herbertz, G. Mall & G. Leyendecker (1999). "The cyclic pattern of the immunocytochemical expression of oestrogen and progesterone receptors in human myometrial and endometrial layers: characterization of the endometrial-subendometrial unit." *Hum Reprod* 14(1): 190-7.
- Nokelainen, P., T. Puranen, H. Peltoketo, M. Orava, P. Vihko & R. Vihko (1996). "Molecular cloning of mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and characterization of enzyme activity." *Eur J Biochem* 236(2): 482-90.
- Nothnick, W. B. & T. M. D'Hooghe (2003). "Medical management of endometriosis: novel targets and approaches towards the development of future treatment regimes." *Gynecol Obstet Invest* 55(4): 189-98.
- Noyes, R. W., A. T. Hertig & J. Rock (1950). "Dating the endometrial biopsy." *Fertil Steril* 1: 3-25.
- Overton, C. E., P. C. Lindsay, B. Johal, S. A. Collins, N. C. Siddle, R. W. Shaw & D. H. Barlow (1994). "A randomized, double-blind, placebo-controlled study of luteal phase dydrogesterone (Duphaston) in women with minimal to mild endometriosis." *Fertil Steril* 62(4): 701-7.
- Paoletti, A. M., G. G. Serra, A. Cagnacci, A. M. Vacca, S. Guerriero, E. Solla & G. B. Melis (1996). "Spontaneous reversibility of bone loss induced by gonadotropin-releasing hormone analog treatment." *Fertil Steril* 65(4): 707-10.
- Parandoosh Z., D. L. Crombie, T. A. Tetzke, J. S. Hayes, R. B. Heap & M. W. Wang (1995). "Progesterone and oestrogen receptors in the decidualized mouse uterus and effects of different types of anti-progesterone treatment." *J Reprod Fertil* 105(2): 215-20.

- Pasqualini, J. R., G. Chetrite, B. L. Nguyen, C. Maloche, L. Delalonde, M. Talbi, M. C. Feinstein, C. Blacker, J. Botella & J. Paris** (1995). "Estrone sulfate-sulfatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: a hypothesis for their role in the evolution of human breast cancer from hormone-dependence to hormone-independence." *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6): 407-12.
- Pasqualini, J. R. & G. S. Chetrite** (2005). "Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* 93(2-5): 221-36.
- Pasqualini, J. R. & C. Ebert** (1999). "Biological effects of progestins in breast cancer." *Gynecol Endocrinol* 13 Suppl 4: 11-9.
- Pasqualini, J. R., J. Paris, R. Sitruk-Ware, G. Chetrite & J. Botella** (1998). "Progestins and breast cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* 65(1-6): 225-35.
- Pelletier, G., V. Luu-The, S. Li, L. Ren & F. Labrie** (2004). "Localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA in mouse tissues." *J Mol Endocrinol* 33(2): 459-65.
- Peltoketo, H., V. Luu-The, J. Simard & J. Adamski** (1999). "17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes." *J Mol Endocrinol* 23(1): 1-11.
- Peltoketo, H., P. Nokelainen, Y. S. Piao, R. Vihko & P. Vihko** (1999). "Two 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (17HSDs) of estradiol biosynthesis: 17HSD type 1 and type 7." *J Steroid Biochem Mol Biol* 69(1-6): 431-9.
- Penning, T. M.** (2003). "Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action." *Hum Reprod Update* 9(3): 193-205.
- Pickersgill, A.** (1998). "GnRH agonists and add-back therapy: is there a perfect combination?" *Br J Obstet Gynaecol* 105: 475-85.
- Pinkert, T. C., C. E. Catlow & R. Straus** (1979). "Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma." *Cancer* 43: 1562-7.
- Poirier, D.** (2003). "Inhibitors of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases." *Curr Med Chem* 10(6): 453-77.
- Prange-Kiel, J., G. M. Rune, M. Zwirner, D. Wallwiener & L. Kiesel** (2001). "Regulation of estrogen receptor alpha and progesterone receptor (isoform A and B) expression in cultured human endometrial cells." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109(4): 231-7.

Prentice, A., B. J. Randall, A. Weddell, A. McGill, L. Henry, C. H. Horne & E. J. Thomas (1992). "Ovarian steroid receptor expression in endometriosis and in two potential parent epithelia: endometrium and peritoneal mesothelium." *Hum Reprod* 7(9): 1318-25.

Razzi, S., A. Fava, A. Sartini, S. De Simone, L. Cobellis & F. Petraglia (2004). "Treatment of severe recurrent endometriosis with an aromatase inhibitor in a young ovariectomised woman." *Bjog* 111(2): 182-4.

Regidor, P. A., C. Vogel, M. Regidor, A. E. Schindler & E. Winterhager (1998). "Expression pattern of integrin adhesion molecules in endometriosis and human endometrium." *Hum Reprod Update* 4(5): 710-8.

Reissmann, T., A. V. Schally, P. Bouchard, H. Riethmüller & J. Engel (2000). "The LHRH antagonist cetrorelix: a review." *Hum Reprod Update* 6(4): 322-31.

Revelli, A., M. Modotti, C. Ansaldi & M. Massobrio (1995). "Recurrent endometriosis: a review of biological and clinical aspects." *Obstet Gynecol Surv* 50(10): 747-54.

Ridley, J. H. (1968). "The histogenesis of endometriosis: A review of facts and fancies." *Obstet Gynecol Surv* 23: 1-35.

Rose, P. G., B. Alvarez & G. T. MacLennan (2000). "Exacerbation of endometriosis as a result of premenopausal tamoxifen exposure." *Am J Obstet Gynaecol* 183: 507-8.

Russell, W. W. (1899). "Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary. Ovarian cysts of müllerian origin." *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 10: 8-10.

Ryan, I. P. & R. N. Taylor (1997). "Endometriosis and infertility: new concepts." *Obstet Gynecol Surv* 52(6): 365-71.

Sampson, J. (1927). "Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity." *Am J Obstet Gynaecol* 14: 422-469.

Sampson, J. A. (1925). "Heterotopic or misplaced endometrial tissue." *Am J Obstet Gynecol* 10: 649-664.

Scarselli, G., F. Rizzello, F. Cammilli, L. Ginocchi & M. E. Coccia (2005). "Diagnosis and treatment of endometriosis. A review." *Minerva Ginecol* 57(1): 55-78.

Schenken, R. S. (1989). Pathogenesis. Endometriosis. "Contemporary Concepts in Clinical Management". R. S. Schenken. Philadelphia, Lippincott: 1-48.

Schmidt, F., K. Sundaram, R. B. Thau & C. W. Bardin (1984). "[Ac-D-NAL(2)1,4FD-Phe2,D-Trp3,D-Arg6]-LHRH, a potent antagonist of LHRH, produces transient edema and behavioral changes in rats." *Contraception* 29(3): 283-9.

Schrodt, G. R., M. O. Alcorn & J. Ibanez (1980). "Endometriosis of the male urinary system: a case report." *J Urol* 124(5): 722-3.

Schweppe, K. W. (1989). Ätiologie, Histologie und Pathophysiologie der Endometriose. Endometriose- neue Therapiemöglichkeiten durch Buserelin. A. E. Schindler and K. W. Schweppe. Berlin, de Gruyter: 3-22.

Schweppe, K. W. (1995). Diagnostik der Endometriose. Der Frauenarzt - Endometriose. A. E. Schindler, K. Semm and B. Runnebaum. Balingen, Demeter: 36-42.

Schweppe, K. W. (2002). "Therapie der Endometriose unter Berücksichtigung der Aktivitätsgrade." *Gynäkologe* 35: 255-261.

Sebastian, S. & S. E. Bulun (2001). "A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project." *J Clin Endocrinol Metab* 86(10): 4600-2.

Sharpe-Timms, K. L. (2002). "Using rats as a research model for the study of endometriosis." *Ann N Y Acad Sci* 955: 318-27; discussion 340-2, 396-406.

Shippen, E. R. & W. J. West, Jr. (2004). "Successful treatment of severe endometriosis in two premenopausal women with an aromatase inhibitor." *Fertil Steril* 81(5): 1395-8.

Shroen, D. (1690). Disputatio Inauguralis Medica de Ulceribus Ulceri.

Somigliana, E., M. Infantino, M. Candiani, M. Vignali, A. Chiodini & M. Busacca (2004). "Association rate between deep peritoneal endometriosis and other forms of the disease: pathogenetic implications." *Hum Reprod* 19(1): 168-71.

Somigliana, E., P. Vigano, G. Rossi, S. Carinelli, M. Vignali & P. Panina-Bordignon (1999). "Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis." *Hum Reprod* 14(12): 2944-50.

Soysal, S., M. E. Soysal, S. Ozer, N. Gul & T. Gezgin (2004). "The effects of post-surgical administration of goserelin plus anastrozole compared to goserelin alone in patients with severe endometriosis: a prospective randomized trial." *Hum Reprod* 19(1): 160-7.

Stocco, D. M. (2002). "Clinical disorders associated with abnormal cholesterol transport: mutations in the steroidogenic acute regulatory protein." *Mol Cell Endocrinol* 191(1): 19-25.

Stoeckemann, K., C. Hegele-Hartung & K. Chwalisz (1995). "Effects of the progesterone antagonists onapristone (ZK 98 299) and ZK 136 799 on surgically induced endometriosis in intact rats." *Hum Reprod* 10(12): 3264-71.

- Story, L. & S. Kennedy** (2004). "Animal studies in endometriosis: a review." *Ilar J* 45(2): 132-8.
- Strowitzki, T., M. Wolff & T. C.** (2003). "Medikamentöse Behandlung der Endometriose." *J Fertil Reprod* 13(3): 13-18.
- Surrey, E. S. & J. Halme** (1992). "Direct effects of medroxyprogesterone acetate, danazol, and leuprolide acetate on endometrial stromal cell proliferation in vitro." *Fertil Steril* 58(2): 273-8.
- Suzuki, T., T. Nakata, Y. Miki, C. Kaneko, T. Moriya, T. Ishida, S. Akinaga, H. Hirakawa, M. Kimura & H. Sasano** (2003). "Estrogen sulfotransferase and steroid sulfatase in human breast carcinoma." *Cancer Res* 63(11): 2762-70.
- Szende, B., G. Srkalovic, K. Groot, K. Lapis & A. V. Schally** (1990). "Growth inhibition of mouse MXT mammary tumor by the luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75." *J Natl Cancer Inst* 82(6): 513-7.
- Tabibzadeh, S., S. Miller, W. C. Dodson & P. G. Satyaswaroop** (1999). "An experimental model for the endometriosis in athymic mice." *Front Biosci* 4: C4-9.
- Takayama, K., K. Zeitoun, R. T. Gunby, H. Sasano, B. R. Carr & S. E. Bulun** (1998). "Treatment of severe postmenopausal endometriosis with an aromatase inhibitor." *Fertil Steril* 69(4): 709-13.
- Telimaa, S., J. Puolakka, L. Ronnberg & A. Kauppila** (1987). "Placebo-controlled comparison of danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis." *Gynecol Endocrinol* 1(1): 13-23.
- Tumasian, K. P., V. V. Bespoiasnaia & I. V. Voronovskaia** (2001). "[Treatment of endometriosis in female infertility]." *Lik Sprava*(3): 103-5.
- Utsunomiya, H., T. Suzuki, C. Kaneko, J. Takeyama, J. Nakamura, K. Kimura, M. Yoshihama, N. Harada, K. Ito, R. Konno, S. Sato, K. Okamura & H. Sasano** (2001). "The analyses of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in human endometrial hyperplasia and carcinoma." *J Clin Endocrinol Metab* 86(7): 3436-43.
- Vernon, M. W.** (1990). "Experimental endometriosis in laboratory animals as a research model." *Prog Clin Biol Res* 323: 49-60.
- Von Recklinghausen, F.** (1896). "Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube: Their origin as remnants of the wolffian body." *Wien Klin Wochenschr* 8: 530.
- Waller, K. G. & R. W. Shaw** (1993). "Gonadotropin-releasing hormone analogues for the treatment of endometriosis: long-term follow-up." *Fertil Steril* 59(3): 511-5.

- Weinbauer, G. F. & E. Nieschlag** (1993). "Comparison of the antigonadotropic activity of three GnRH antagonists (Nal-Glu, Antide and Cetrorelix) in a non-human primate model (*Macaca fascicularis*)." *Andrologia* 25(3): 141-7.
- Wheeler, J. M.** (1989). "Epidemiology of endometriosis-associated infertility." *J Reprod Med* 34(1): 41-6.
- Wiegerinck, M. A., P. A. Van Dop & I. A. Brosens** (1993). "The staging of peritoneal endometriosis by the type of active lesion in addition to the revised American Fertility Society classification." *Fertil Steril* 60(3): 461-4.
- Witz, C. A.** (2002). "Pathogenesis of endometriosis." *Gynecol Obstet Invest* 53 Suppl 1: 52-62.
- Wolfler, M. M., F. Nagele, A. Kolbus, S. Seidl, B. Schneider, J. C. Huber & W. Tschugguel** (2005). "A predictive model for endometriosis." *Hum Reprod* 20(6): 1702-8.
- Yamamoto, T., T. Noguchi, T. Tamura, J. Kitawaki & H. Okada** (1993). "Evidence for estrogen synthesis in adenomyotic tissues." *Am J Obstet Gynecol* 169(3): 734-8.
- Yanaihara, A., Y. Otsuka, S. Iwasaki, T. Okai & T. Yanaihara** (2005). "Strong expression of steroid sulfatase in human cumulus cells in patients with endometriosis." *Fertil Steril* 84(2): 464-7.
- Yano, T., J. Pinski, K. Szepeshazi, G. Halmos, S. Radulovic, K. Groot & A. V. Schally** (1994). "Inhibitory effect of bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75 on the growth of MCF-7 MIII human breast cancer xenografts in athymic nude mice." *Cancer* 73(4): 1229-38.
- Yue, W., J. Wang, A. Savinov & A. Brodie** (1995). "Effect of aromatase inhibitors on growth of mammary tumors in a nude mouse model." *Cancer Res* 55(14): 3073-7.
- Zaino, R. J., P. G. Satyaswaroop & R. Mortel** (1985). "Histologic response of normal human endometrium to steroid hormones in athymic mice." *Hum Pathol* 16(9): 867-72.
- Zamah, N. M., M. G. Dodson, L. C. Stephens, V. C. Buttram, Jr., P. K. Besch & R. H. Kaufman** (1984). "Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice." *Am J Obstet Gynecol* 149(6): 591-7.
- Zeitoun, K., K. Takayama, H. Sasano, T. Suzuki, N. Moghrabi, S. Andersson, A. Johns, L. Meng, M. Putman, B. Carr & S. E. Bulun** (1998). "Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol." *J Clin Endocrinol Metab* 83(12): 4474-80.
- Zeitoun, K. M. & S. E. Bulun** (1999). "Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target." *Fertil Steril* 72(6): 961-9.

Lebenslauf

Name: Sabine Firnhaber, geb. Fechner

Geburtsdatum: 11.11.1974

Geburtsort: Recklinghausen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Konfession: evangelisch

Schul Ausbildung: 1981-1985: Grundschule Im Romberg, Recklinghausen
1985-1994: Marie-Curie-Gymnasium, Recklinghausen
1994: Abitur
1994-1995: Freiwilliges diakonisches Jahr in den Werkstätten für Behinderte, Recklinghausen

Studium: 1996-1998: Studium der Sozialpädagogik, Evangelische Fachhochschule, Bochum
1996-2002: Studium der Diplom-Biologie, Ruhr-Universität-Bochum
Diplomarbeit mit dem Thema: Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen des Lysozyms im Verdauungstrakt von *Triatoma infestans*

Studienabschluss: Diplom-Biologin seit dem 10.09.2002

Promotion: Dezember 2002-Dezember 2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen, bei Frau Prof. Winterhager.
Thema: „Expression und Regulation von Enzymen des Östrogenmetabolismus in humanen Endometriumläsionen kultiviert in der Nacktmaus“

Veröffentlichungen:

Fechner S, Husen B, Thole H, Schmidt M, Gashaw I, Kimmig R, Winterhager E, Grümmer R (2006) (in press): Expression and regulation of estrogen converting enzymes in ectopic human endometrial tissue.

Kollien* AH, Fechner* S, Waniek PJ, Schaub GA (2003): Isolation and characterization of a lysozyme-encoding gene from the gut of the reduviid bug *Triatoma infestans*. Arch. Insect Biochem. Physiol. (*gleichwertige Leistungen)

Publizierte Abstracts:

Grümmer R, Fechner S, Schwarzer F, Absenger Y, Schmidt M, Winterhager E (2005): An in vivo-model to investigate cell biological mechanisms involved in the pathogenesis of peritoneal endometriosis. Verh. Anat. Ges. 2005: 210-211.

Fechner S, Schwarzer F, Gashaw I, Schmidt M, Winterhager E, Grümmer R (2005): An in vivo-model to investigate therapeutical approaches for the treatment of peritoneal endometriosis. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 113: S11.

Grümmer R, Fechner S, Schwarzer F, Absenger Y, Schmidt M, Winterhager E (2004): An experimental in vivo model for peritoneal endometriosis to develop therapeutical strategies interfering with angiogenesis and estrogen metabolism. Biol. Reprod., special issue (37th Annual Meeting of the SSR), 817.

Fechner S, Schwarzer F, Absenger Y, Schmidt M, Winterhager E, Grümmer R (2004): Evaluation of an in vivo-model for endometriosis. Human Reprod. 19 (Suppl 1), P486.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Expression und Regulation von Steroidhormonrezeptoren sowie von Enzymen des Östrogenmetabolismus in humanen Endometriumläsionen kultiviert in der Nacktmaus“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Sabine Firnhaber befürworte.

Essen, den

Prof. Dr. Elke Winterhager

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den

Sabine Firnhaber

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den

Sabine Firnhaber

